FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 10

Sur l'emploi de l'acide phytique dans l'étude des protéases

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

Le 18 octobre 1960

par

Simone KERAMIDAS

Née le 11 juillet 1932 à Conakry (Guinée)

Pharmacien, ex-préparateur de Chimie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse :

M. le Professeur **C. DUMAZERT** Président,

MM. les Professeurs :

F. PELLISSIER
M. MOURGUE
C. GREBUS

Assesseurs

LINO-IMP., BOULEVARD DESPLACES - MARSEILLE (X)

1960

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547027_0034

Simone KERAMIDAS

Sur l'emploi de l'acide phytique dans l'étude des protéases

Travail du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT
Secrétaire Principal : P. MOUCHET — Bibliothécaire : Mlle PERRIN
Secrétaire Principal honoraire : J. COMTE
Professeurs honoraires : MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, JOYEUX, MOIROUD, MONGES, RIMATTEI, ROCHE, CHAUVIN.

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie appliquée et de Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique	ARNOUX
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie Minérale	MOURGUE
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale	DE VERNEJOUL
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique	SALMON
Clinique de Chirurgie Thoracique	DOR
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	CREMIEUX
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique de stomatologie	MARONNEAUD
Clinique d'Urologie	N...
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Sociale	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	LENA
Pathologie interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI

R. UNIV. BIBLIOTHEEK

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. ROUX
M. MOURGUE

MM. GREBUS
MERCIER J.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD P.
BOURRET
CORRIOL
CRISTAUX
DEPIEDS
DESANTI
GAMBARELLI

MM. GEVAUDAN
LISSITZKY
PASTOR
PAYAN
STAHL
TAMALET

AGREGES EN EXERCICE

MM. BERARD
BERNARD R.
BONNAL
CHARPIN
CHAUVIN
COMITI
DALMAS
DEVIN
FARNARIER

MM. GERARD
LEGRE
MOUREN
ORSINI
REBOUD
SARLES
SERMENT
SIMONIN
TEMIME
TRIFAUD

AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER
FIGARELLA
GRANJON
IMBERT
MONGES H.

MM. OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD

Chargé des fonctions de Maître de conférence

Physiologie ..... M. ZWIRN

Chargés des fonctions d'Agrégé

Clinique des Maladies du Système Nerveux ... M. BOUDOURESQUE
Clinique de Stomatologie ..... M. LACHARD
Médecine Légale ..... M. GRAS

A MES PARENTS

A MON EPOUX

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur C. DUMAZERT

qui nous a inspiré cette thèse et n'a cessé de nous prodiguer avec tant de bienveillance, ses précieux conseils et son admirable enseignement.

Il trouvera ici l'expression de notre profonde gratitude.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE

DE MARSEILLE

A Monsieur Claude GHIGLIONE

Chargé de Cours

Assistant de Chimie

qui nous a aidé à aborder les problèmes difficiles avec précision et méthode, et nous a guidée dans la réalisation de ce travail.

Avec toute notre amitié, qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

INTRODUCTION

Les enzymes protéolytiques sont universellement répandus. Leur découverte est fort ancienne et les premières données acquises sur leur connaissance résultent de recherches entreprises pour l'étude des sucs digestifs. C'est ainsi que dès 1785, SPALLANZANI, reprenant les expériences de REAUMUR, administra à des corneilles des tubes garnis d'éponges. Les tubes ayant été rejetés, les éponges exprimées fournirent un suc capable de dissoudre la viande à la température du corps. La portée de ces expériences demeura incomprise à cette époque. Il fallut attendre 1836 pour que SCHWANN découvre dans la macération chlorhydrique d'estomac de porc, la pepsine, substance possédant des propriétés analogues à celles de la diastase isolée par PAYEN et PERSOZ en 1833 dans l'orge germé. Ces recherches ont ouvert les voies à l'enzymologie. Depuis, un nombre de travaux considérable a été consacré aux enzymes protéolytiques dans le but de les isoler, de connaître leurs modes d'action et enfin d'établir leur structure.

Par définition, les enzymes protéolytiques catalysent la scission hydrolytique des liaisons peptidiques (— CO — NH —) des protéines et des peptides, essentiellement représentée par la réaction fondamentale suivante :

$$R — CO — NH — R' + HOH \longrightarrow R — COOH + R' — NH_2$$

Ce sont des hydrolases et elles possèdent les propriétés générales caractéristiques des enzymes : thermolabilité, existence d'une disproportion entre la quantité d'enzyme introduite et celle du substrat transformé, valeur bien définie de pH et de la température du milieu, pour qu'elles présentent leur maximum d'activité

Il existe un très grand nombre d'enzymes protéolytiques et divers systèmes de classification leurs ont été appliqués. Ils sont basés, soit sur l'origine de l'enzyme, soit sur son substrat, soit enfin sur la nature même de la liaison peptidique gue l'enzyme est susceptible de rompre.

C'est ainsi que l'on peut distinguer essentiellement deux groupes d'enzymes protéolytiques. Le premier comprend les enzy-

mes digestifs libérés dans l'appareil gastro-intestinal ; ils sont indispensables aux organismes supérieurs pour dégrader les substances protéiques en amino-acide et polypeptides simples afin de permettre l'assimilation des aliments naturels. Le deuxième groupe est représenté par les enzymes endo-cellulaires ou cathepsines qui ne sont jamais libérés à l'état normal par la cellule dans laquelle ils agissent (WILLSTAETTER et BAMMANN [53]). Leur rôle est encore très mal connu ; on a prétendu qu'ils joueraient un rôle dans la biogénèse des protéines protoplasmiques.

Les enzymes protéolytiques se présentent très souvent sous deux formes : l'une active, l'autre inactive. Ils sont généralement sécrétés sous cette dernière forme (pro-diastase ou zymogène) qui n'offre pas de danger pour les cellules sécrétrices. L'activation de catalyseurs inactifs en catalyseurs actifs est un problème auquel de nombreuses recherches ont été consacrées.

Deux modes d'activation ont été décrits. Le premier mis en évidence dans le cas des trois enzymes les plus importants (pepsine, trypsine, chymotrypsine) consiste en un démasquage de la partie active de la molécule, démasquage réalisé par une protéolyse limitée du précurseur inactif ou zymogène (pepsinogène, trypsinogène, chymotrypsinogène). Cette protéolyse qui conduit à la rupture de certaines liaisons intra-moléculaires, en général peptidique, se traduit par l'apparition de nouveaux groupements terminaux et par l'élimination d'au moins un peptide caractéristique.

Dans le cas des cathepsines, l'état normal des enzymes au sein de la cellule pose un problème biochimique non encorce parfaitement résolu. WILLSTAETTER et RONDERVAND proposent de distinguer deux catégories : les **lyo-enzymes** directement extractibles de tissus par un liquide dispersant (eau, glycérol) et les **desmo-enzymes** qui ne sont pas solubilisés dans les mêmes conditions. L'autolyse provoquée par l'action protéolysante de certains enzymes endocellulaires libère les desmo-enzymes qui sont solubilisés en lyo-enzymes. Il semble à l'heure actuelle que les cathepsines se trouvent en général liées d'une façon assez stable aux microsomes.

Enzymes digestifs et cathepsines ont été divisés en « **protéinases** » capables d'attaquer les protéines et en « **peptidases** » dont l'action se limite à la dégradation de polypeptides. On admet aujourd'hui que tous les enzymes sont capables d'hydrolyser des peptides de poids moléculaire faible lorsque certaines exigences de spécificité sont satisfaites. On reconnaît donc aux protéases une activité peptidasique. En règle générale, les protéases sont caractérisées par le fait qu'elles hydrolysent les liaisons peptidiques éloignées d'un groupement terminal carboxylique ou aminé et par conséquent situées à l'intérieur de la molécule protéique ; c'est pourquoi, on les désigne sous le nom d'endopeptidases. Tel est le cas de la pepsine, de la trypsine, de la chymotrypsine, dont le mode d'action conduit à la formation de fragments protidiques de poids moléculaire élevé (albuminoses et peptones). Les **exopeptidases** se

distinguent des enzymes précédents par le fait qu'elles n'agissent que sur les liaisons situées aux extrémités de chaînes peptidiques, c'est-à-dire voisines des groupements terminaux, en libérant en général des amino-acides ou des polypeptides courts.

L'activité des enzymes protéolytiques est liée à un certain nombre de facteurs physicochimiques relatifs au milieu réactionnel parmi lesquels il faut citer d'une part la concentration en ions H^+ et d'autre part le potentiel d'oxydo-réduction.

Les recherches de KJELDAHL, FERNBACH et SORENSEN ont montré l'importance du pH sur l'activité des enzymes. Si l'on construit une courbe en portant en ordonnées les activités diastasiques et en abscisses les pH, on obtient une courbe présentant un optimum marqué. Le pH optimum d'action ainsi défini est une donnée caractéristique de l'enzyme. Les enzymes qui agissent sur un même substrat mais qui possèdent des pH optima d'action différents sont nommés isodynames. Lorsque l'on dispose d'un tel mélange, on peut établir une courbe de la variation de l'activité en fonction du pH. L'activité présentera des valeurs optima correspondant aux pH les plus favorables à l'activité des différents enzymes. Pour un substrat donné, le pH optimum est caractéristique de l'enzyme étudié.

Le potentiel d'oxydo-réduction a lui aussi une influence considérable sur l'activité de certains enzymes protéolytiques. On peut rattacher à ce phénomène l'influence de divers activateurs chimiques qui ont été mis en évidence dans le cas des cathepsines par WALDSCHMIDT-LEITZ [51, 52], GRASSMANN et Coll. [23, 24] qui ont montré que les enzymes sont plus actifs lorsqu'ils sont en présence de substances réductrices telles que l'acide sulfhydrique, la glutathion, l'acide ascorbique. Dans le cas de la papaïne, REISS [40] a pu établir que l'activité est pratiquement constante et maximum au-dessus d'un potentiel critique (rH = 23). Les substances de caractère oxydant par contre sont des inhibiteurs.

Les enzymes protéolytiques sont des catalyseurs protéiques qui ont la structure chimique de substrats naturels sur lesquels ils agissent. Le problème de la nature des caractères structuraux de ces molécules en relation de cause à effet avec les manifestations de leur activité biologique, n'est pas encore élucidé. Le nombre de centres actifs est encore mal déterminé et semble à l'heure actuelle petit et sans doute rarement supérieur à un.

Les progrès importants réalisés ces dernières années ont certainement pour origine l'obtention par NORTHROP des premiers enzymes protéolytiques connus à l'état cristallisé (1930). Dès lors il a été possible d'effectuer des travaux précis avec des préparations enzymatiques bien définies, à la fois actives et homogènes, et d'établir dans une certaine mesure, la notion de spécificité entre un enzyme déterminé et les liaisons peptidiques qu'il est susceptible de rompre : liaisons peptidiques définies par leur place dans la molécule et par la nature des amino-acides qu'elles unissent.

Cette notion de spécificité a été établie par deux voies : La première consiste à étudier l'action des enzymes protéolytiques sur un grand nombre de substrats synthétiques de structure simple. Cette voie a été ouverte par les travaux de BERGMANN et ses Collaborateurs, en particulier FRUTON [20, 21, 22]. Si la mise en œuvre des substrats synthétiques éloigne l'expérimentation des conditions physiologiques, il n'en demeure pas moins que les expériences de ce type permettent d'apporter les données précises sur la spécificité des actions enzymatiques. Elles permettent également de caractériser dans certaines conditions un enzyme dans un mélange. Nous avons rassemblé dans le tableau n° I les substrats synthétiques les plus représentatifs des principaux enzymes protéolytiques.

La seconde voie d'accès beaucoup plus difficile conduit à l'utilisation comme substrat des peptides naturels, ou mieux des protéines de faible poids moléculaire (insuline, lysozyme, hormones hypophysaires) et ensuite à analyser les peptides courts obtenus, à reconstituer la molécule protéique et par recoupement à déterminer les liaisons peptidiques rompues. Cette technique (SANGER, [41, 42]) a été utilisée dans le double but de mieux connaître la spécificité des enzymes et de déterminer l'enchaînement des aminoacides dans les peptides et les protéines utilisées comme substrat.

Si les progrès importants réalisés ces dernières années sont la conséquence directe de l'obtention des enzymes protéolytiques dans un état purifié, il n'en demeure pas moins qu'ils résultent aussi de progrès réalisés dans les techniques analytiques utilisées pour suivre les protéolyses, techniques qui n'ont cessé de se perfectionner.

Les méthodes élaborées sont basées sur l'étude de la dégradation d'un substrat, celui-ci pouvant être naturel (protéine) ou synthétique. Leur diversité résulte du principe adopté pour la mise en évidence de l'hydrolyse et est en relation étroite avec la complexité du substrat.

On peut se proposer, soit d'estimer la quantité de substrat attaqué après un certain temps de contact avec l'enzyme, soit de déterminer le nombre de groupements aminés et carboxyliques apparus, soit, enfin, de doser un produit provenant spécifiquement de l'hydrolyse du substrat.

Le substrat idéal est représenté par une substance de structure définie sur lequel l'enzyme agit selon un processus unique de dégradation et qui conduit à l'obtention d'un seul composé qui n'est pas initialement présent dans le substrat et dont on connaît une méthode de dosage simple, précise et spécifique.

Les substrats synthétiques proposés par BERGMANN et Coll. [20, 21, 22] (voir tableau n° I) répondent le mieux à cette définition. Ils permettent l'étude de certaines protéinases (dont on connaît le groupement sensible spécifique) et des peptidases (di ou tri-peptidases).

TABLEAU I

Substrats synthétiques caractéristiques des principaux enzymes protéolytiques [20, 21, 22]

Enzymes	Substrats
Chymotrypsine	Acétyl - L - tyrosinamide Acétyl - L - tyrosine éthyl ester
Trypsine	α - benzoyl - L - arginamide α - benzoyl - L - arginine éthyl ester Hippuryl - L - argininamide Hippuryl - L - arginine éthyl ester
Pepsine	Carbobenzoxy - L - glutamyl - L - tyrosine Acétyl - L - phénylalanyl - L - phényl - alanine
Papaïne	α - benzoyl - L - argininamide
Ficine	»
Bromeline	»
Cathepsine A	Carbobenzoxy - L - glutamyl - L - tyrosine
Cathepsine B	α - benzoyl - L - argininamide
Cathepsine C	Glycyl - L - phénylalaninamide
Carboxypeptidase	Carbobenzoxyglycyl - L - phényl-alanine Carbobenzoxyglycyl - L - trypto-phane
Leucine aminopeptidase	L - leucinamide
Aminotripeptidase	Glycylglycylglycine
Prolidase	Glycyl - L - proline
Iminodipeptidase	L - prolylglycine
Glycylglycine dipeptidase	Glycylglycine
Carnosinase	β - alanyl - L - histidine (carno-sine)
Dehydropeptidase I	Glycyldehydroalanine
Dehydropeptidase II	Chloroacétyldehydroalanine

Il est des cas où il est nécessaire d'avoir recours à des substrats naturels protéiques, par exemple lorsque l'on envisage l'étude des extraits bruts ou peu purifiés de tissus animaux ou végétaux. Il sera difficile ici d'envisager une spécificité enzyme-liaison rompue, à cause du nombre d'enzymes présents dans l'extrait dont plusieurs peuvent agir sur un même substrat. De nouveaux enzymes ne peuvent être mis en évidence sur la base de détermination utilisant des substrats synthétiques car il est possible que sur le lot de substrats testés aucun ne convienne à l'enzyme inconnu alors qu'on peut espérer que toutes les protéases peuvent agir sur une protéine prise comme substrat.

Les protéines les plus couramment utilisées sont soit insolubles : fibrine, caséine, ovalbumine dénaturée, soit solubles : hémoglobine, globine, édestine.

⁂

Ce sont les méthodes analytiques permettant l'étude de la dégradation des protéines qui ont retenu notre attention et dont nous étudierons brièvement les principales. Elles peuvent se classer en deux groupes :

1° Les méthodes basées sur la détermination du nombre de liaisons rompues par le dosage des groupements aminés ou carboxyliques libérés. Afin d'effectuer de tels dosages on peut, soit réaliser des dosages titrimétriques des fonctions acides ou basiques, soit doser l'ammoniac ou le gaz carbonique provenant des fonctions aminées ou carboxyliques, après désamination ou décarboxylation de ces fonctions. Ces opérations peuvent être réalisées par voie chimique ou enzymatique.

2° On peut également se proposer de déterminer la quantité de substrat non attaqué. Il est en général nécessaire de séparer la protéine intacte de ses produits de dégradation en faisant intervenir un agent déféquant.

A - Méthodes permettant de doser les groupements aminés ou carboxyliques

I. — METHODES TITRIMETRIQUES

La protéolyse conduisant à la libération d'un nombre égal de groupements aminés et de groupements carboxyliques, amène à mettre en œuvre des procédés dans lesquels on bloque un groupe fonctionnel, ou dans lesquels l'utilisation de solvants organiques fait rétrograder ou exalte l'acidité ou l'alcalinité.

a) Formoltitration

Cette méthode proposée par SORENSEN [45] utilise le changement de la couche de titration des groupements aminés, résultant de leur réaction avec la formaldéhyde. On admet à l'heure actuelle que deux molécules de formaldéhyde peuvent se combiner avec un groupement aminé des amino-acides, peptides, protéines selon les équations suivantes le plus généralement admises à l'heure actuelle :

$$R\,NH_3^+ \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} R\,NH_2 + H^+$$

$$R\,NH_2 + 2\,CH_2O \longrightarrow R\,N\,(CH_2OH)_2$$

Ces équations montrent qu'il y a un équilibre dans la dissociation du cation $R\,NH_3^+$ et conduit à une apparence d'acidité de ce groupe. Le déplacement dans le sens 1 s'effectue par la présence dans le milieu réactionnel de formaldéhyde à la concentration de 10 %.

Ce déplacement déterminé par de nombreux auteurs [19] est égal à 2,5 à 3 unités pH et permet de doser 90 % de groupements aminés présents, à l'aide d'une solution diluée d'acide chlorhydrique. Le pH que l'on doit atteindre afin d'assurer une détermination correcte, est égal à 8.5. C'est celui correspondant au premier changement de coloration de la phénolphtaléine qui est l'indicateur de choix. La méthode de SORENSEN permet une précision de ± 10 %.

b) Titration en milieu alcoolique

Les groupements aminés libres des substances protidiques peuvent être titrés dans un milieu contenant 90 % d'éthanol. Le

cation $R\,NH_3^+$ peut être titré dans ce cas par une solution alcoolique de KOH selon la réaction suivante :

$$R\,NH_3^+ + OH^- \Longleftrightarrow R\,NH_2 + H_2O$$

L'influence des groupements carboxyliques peut se manifester dans certaines conditions et troubler le dosage. La thymolphtaléine est utilisée comme indicateur. Le « end point » est donné par la coloration bleue pâle obtenue à pH = 12, pH de virage de l'indicateur en milieu fortement alcoolique. C'est une des méthodes qui a été parmi les plus utilisées. WILLSTAETTER et WALDSCHMIDT-LEIZ [54], FOREMAN [18], GRASSMANN et HEYDEL [25] y ont apporté les principales modifications techniques. Sa précision est ± 5 %.

c) Titration en milieu acétonique

Les groupements acides ont pour pH des valeurs voisines de 2,0 - 2,5 et ne peuvent être titrés en solution aqueuse. Par contre lorsque le milieu a une faible constante diélectrique, par exemple, en présence de 90 % d'acétone, on assiste à une rétrogradation de la dissociation qui correspond à un changement de pH apparent vers les régions plus alcalines.

$$R\,COOH \overset{H_2O}{\underset{90\ \%\ \text{d'acétone}}{\Longleftrightarrow}} R\,COO^- + H^+$$

Dans ce cas, les groupements peuvent être titrés par un acide fort (acide chlorhydrique 0,01 M en solution alcoolique). La variation de pH peut atteindre 5 unités pH et permet de réaliser le dosage de 99,3 % de groupements acides lorsque la titration se termine pour un « point final » situé à pH = 4. Le benzène - azo - α - naphtylamine constitue l'indicateur. Cette technique n'est pas spécifique des groupements carboxyliques des α aminoacides. C'est ainsi par exemple que l'on peut titrer les ions phosphates, oxalates, pyruvates, citrates. Cette méthode a été préconisée par LINDERSTRON-LANG [29] qui en a décrit une ultramicrométhode [30], de même ZAMECNIK, LAVIN et BERMANN [55].

II. — METHODES GAZOMETRIQUES

a) Dosage de l'azote aminé

La méthode préconisée par VAN SLYKE [47] a été plusieurs fois modifiée. NEILL [48] en a donné un protocole particulièrement adapté au besoin de l'étude de l'hydrolyse des protéines. Son principe repose sur le fait que les amines primaires aliphatiques réagissent avec l'acide citreux naissant en milieu acide pour

donner un alcool, de l'eau et de l'azote moléculaire selon l'équation :

$$R\,NH_2 + NO_2H \longrightarrow ROH + H_2O + N_2\uparrow$$

L'azote est dosé par gazométrie à l'aide d'un appareil spécial. Cette technique est longue, délicate à mettre en œuvre, difficile à utiliser pour des dosages en série. Elle n'est pas spécifique de la fonction amine des α - amino - acides, car toutes les amines primaires aliphatiques et même l'ammoniac réagissent avec l'acide nitreux. Des réactions parasites peuvent se produire (KENDRICK et HANKE [28]). Le glycocolle et la cystéine (en l'absence d'IK) conduisent à des résultats par excès. C'est une méthode précise, reproductible à ± 1 % près. Bien qu'elle ne puisse être utilisée pour des déterminations rapides et multiples, appliquée avec certaines précautions, elle constitue une méthode de référence.

b) Dosage des fonctions carboxyliques par décarboxylation

Plusieurs principes ont été retenus dans le but de réaliser la décarboxylation quantitative des fonctions carboxyliques. Le dosage du gaz carbonique libéré étant dosé, soit par titrimétrie, soit par gazométrie.

1/ Décarboxylation chimique.

Décrite par VAN SLYKE et MAC FADYEN [49] elle repose sur le fait que la ninhydrine (tricetohydrindène) est susceptible, en milieu acide (pH = 1 à 5) et 100° C de décarboxyler.

Le dosage de gaz carbonique peut être réalisé, soit titrimétriquement (VAN SLYKE et Coll. [49]), le gaz carbonique étant piégé dans un excès d'une solution titrée de baryte, l'excès de la base déterminé à l'aide d'une solution 0,02855 - N d'acide chlorhydrique en présence de rouge de crésol pris comme indicateur (précision ± 1 %) ; soit gazométriquement (VAN SLYKE, MAC FADYEN [49]), à l'aide d'un appareillage spécial, c'est un procédé long, délicat, mais d'une bonne précision (± 1 %).

2/ Décarboxylation enzymatique.

Deux méthodes sont rencontrées ici, l'une faisant appel à l'aminoacide oxydase, la seconde aux aminoacides décarboxylases.

Décarboxylation par l'aminoacide oxydase. — Elle a été élaborée par ZELLER et MARITZ [56], SINGER et KEARNEY [44]

et utilise la L-amino-oxydase de venin de serpent qui catalyse la décarboxylation des aminoacides en présence d'oxygène selon l'équation générale :

$$R\,CH\,(NH_2) - COOH + O_2 + H_2O \longrightarrow R\,CO\,COOH + NH_3 + H_2O_2$$

$$R\,CO\,COOH + H_2O_2 \longrightarrow R\,COOH + \uparrow CO_2 + H_2O$$

Le dosage du gaz carbonique est réalisé par gazométrie. Cette méthode, très élégante, permet de doser la majorité des aminoacides, mais la L-aminoacide oxydase d'ophidien peut décarboxyler les peptides, la glycine, les D-aminoacides et les composés possédant un groupement aminé secondaire (proline et oxyproline). Elle est donc limitée au cas où les α-amino-acides sont libérés. Il faut noter également que certaines substances (acides carboxyliques, acides aromatiques sulfoniques) sont des inhibiteurs de l'enzyme.

Décarboxylation par l'amino-acide décarboxylase. — On utilise ici des enzymes qui catalysent la décarboxylation des aminoacides selon l'équation :

$$R\,CH\,(NH_2)\,COOH \longrightarrow R\,CH_2 - NH_2 + \uparrow CO_2$$

Douze décarboxylases sont connues à l'heure actuelle. Chacune est spécifique d'un aminoacide et uniquement pour l'isomère L [43]. Ces enzymes sont d'origine bactérienne. Le dosage du gaz carbonique est réalisé par gazométrie. La précision de la méthode est de ± 5 %.

Cette méthode est applicable seulement aux aminoacides. Chacun d'entre eux nécessite l'emploi d'un enzyme qui lui est spécifique.

B - Méthodes basées sur la détermination du substrat intact ou des produits de la protéolyse

Ce sont ici des méthodes non spécifiques, nécessitant un substrat protéique et dans lesquelles on apprécie la quantité de substrat non attaqué, ou celle des peptides et aminoacides apparus au cours de la protéolyse. Elles comportent, l'élimination de la protéine non attaquée à l'aide d'un réactif déféquant qui est en général l'acide trichloracétique.

I. — METHODE COLORIMETRIQUE A LA NINHYDRINE

Les aminoacides possédant un groupement α aminé libre réagissent avec la ninhydrine pour donner un dérivé coloré : le dicétohydrindilène dicétohydrindamine. Le produit coloré possède un maximum d'absorption pour une longueur d'onde de 570 mμ (sauf avec la proline et l'hydroxyproline : 440 mμ).

Cette technique décrite par MOORE et STEIN [35]) permet de donner des résultats reproductibles à ± 3 %. Elle est utilisable sans éliminer la protéine inattaquée, mais n'est pas spécifique des α-aminoacides libres : l'ammoniac, les amines, les peptides conduisent à un dérivé coloré différent de celui obtenu avec les aminoacides. Facile à mettre en œuvre, cette technique ne permet que de suivre les variations au cours d'une protéolyse.

II. — METHODES FAISANT APPEL A L'ELIMINATION DU SUBSTRAT INTACT

Toutes les méthodes dont nous allons maintenant rappeler brièvement le principe, nécessitent avant tout l'élimination spécifique du substrat intact à l'aide d'un réactif déféquant qui est dans la majorité des cas, l'acide trichloracétique. Cette opération préliminaire réalisée, on se trouve en présence d'une liqueur trichloracétique contenant théoriquement tous les produits de la protéolyse. On peut les doser par une grande variété de méthodes :

a) Après destruction de la matière organique on dose l'azote par micro-kjeldahl.

b) On peut faire appel au fait que les polypeptides libérés contiennent de la tyrasine et du tryptophane qui peuvent être dosés

soit par la coloration bleue qu'ils donnent avec le réactif des phénols de FOLIN et CIOCALTEU [17], soit spectrophotométriquement car ces aminoacides absorbent la lumière ultra-violette avec un maximum pour la longueur d'onde de 280 uμ (NORTHROP [36]).

c) On peut apprécier la quantité de peptides présents dans la liqueur par la coloration du « biuret » donnée par les liaisons peptidiques en présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin. En général, toutes les méthodes utilisables pour doser l'azote peptidique peuvent être utilisées (CARRET [9]).

A part le premier cas envisagé (dosage de l'azote total peptidique par micro-kjeldahl) où les résultats peuvent être exprimés par le rapport de l'azote total peptidique à l'azote total protéique mis en œuvre, cet ensemble de méthodes ne peut donner qu'une idée de la variation de la protéolyse en se basant sur la coloration obtenue à l'aide d'une substance prise arbitrairement comme étalon (tyrosine).

⁂

Nous venons de citer les principales méthodes qui peuvent être utilisées afin d'étudier l'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques. Certaines, trop spécifiques, n'ont pas été exposées, car cela sortirait du cadre de notre travail. Pour terminer, nous ne ferons qu'indiquer les méthodes basées sur des principes paticuliers qui, malgré tout, nous paraissent suffisamment originaux pour être notés :

— La méthode de LINDERTROM-LANG et JACOBSEN [31, 27], ultra-microméthode adaptable à l'histochimie, basée sur la dilatométrie. Elle permet de mesurer la variation du volume de solutions de protéines soumises à la protéolyse et dû à l'effet d'électrostriction accompagnant l'apparition de nouveaux groupements fonctionnels dans le milieu réactionnel.

— La méthode de NORTHROP [37] basée sur la variation de la viscosité d'une solution protéique en fonction du taux d'hydrolyse.

— La méthode de VON EULER [50] et NORTHROP [37] permettant de mesurer l'augmentation de conductivité au cours de l'hydrolyse des protéines et des peptides.

— Enfin, signalons un procédé de titration dû à POPE et STEVENS [38] utilisant le fait que les aminoacides donnent des complexes stables et spécifiques avec certains sels de cuivre.

Il existe également des procédés basés sur la coagulation du lait, procédés extrêmement simples, utilisables lorsque l'enzyme possède une action pepsique (pepsine, chymotrypsine. papaïne), c'est-à-dire, est capable de réaliser la coagulation du lait.

Nous venons brièvement de rappeler les propriétés générales des enzymes protéolytiques ainsi que les principales techniques utilisées pour déterminer leur activité. Bien que l'emploi des substrats synthétiques semble représenter la base des méthodes de l'avenir, il paraît préférable dans l'état actuel de nos connaissances d'utiliser un matériel protéique comme substrat. Dans ce cas, les principales méthodes que nous avons passé en revue présentent des avantages et des inconvénients. En effet, les méthodes fondées sur la détermination du nombre de groupements aminés ou carboxyliques libérés au cours de l'hydrolyse, sont soit simples, faciles à mettre en œuvre, rapides mais d'une précision assez faible (± 5 %), soit précises, longues, délicates et se prêtent assez mal à un travail de série.

Les techniques permettant de doser la quantité de substrat intact à un instant déterminé de la protéolyse méritent d'attirer l'attention. Dans ce but on a cherché à utiliser certains réactifs déféquants et l'acide trichloracétique est le plus généralement mis en œuvre. On sait que ce réactif n'est pas spécifique des protéines intactes et qu'il entraîne avec la précipitation de celles-ci de nombreux produits résultant de la protéolyse.

On peut donc se proposer de rechercher un réactif permettant une précipitation spécifique du substrat intact lorsque celui-ci est accompagné de ses produits de dégradations enzymatiques. Au cours d'études sur l'acide phytique, COURTOIS et Coll. [2, 3, 4, 5, 6, 10] ont constaté que l'acide phytique (acide mono inosito hexa ortho phosphorique) formait un précipité avec des protéines globulaires et ces auteurs en ont précisé le mécanisme. Ils pensent que chacune des 6 fonctions acides très forts de l'acide phytique s'unit de pH 4.0 à 2.0 avec un groupement basique de la protéine ; cette salification provoque une modification de l'architecture de la protéine, il en résulte une insolubilisation de la combinaison acide phytique - protéine ; la teneur en phosphore phytique du précipité est directement proportionnelle au nombre de groupes basiques de la protéine désigné conventionnellement par Nb pour une protéine ramenée au poids moléculaire de 100.000.

Avec les protides de faibles poids moléculaires, la salification des groupes basiques par l'acide phytique ne provoque pas de modifications assez importantes de leur architecture générale pour entraîner leur insolubilisation. C'est ainsi que l'acide phytique ne précipite pas les peptones (COURTOIS et BARRE [11]) ou la gélatine (HILL et TYLER [26]) (loc. cité [12]).

L'acide phytique paraît, à priori, constituer un réactif particulièrement intéressant. Si sa spécificité peut être démontrée, il est susceptible d'être utilisé d'une manière générale en enzymologie afin d'étudier l'activité des enzymes protéolytiques. On peut également alors penser que l'acide phytique peut être à la base d'une technique permettant de tenter de caractériser les différents enzymes protéolytiques contenus dans un mélange complexe. En

effet, nous avons déjà signalé que les enzymes isodynames pouvaient se caractériser par leurs pH optimum d'action.

L'élaboration d'une telle méthode nécessite un contrôle expérimental qui ne peut être réalisé que grâce à l'étude d'un enzyme protéolytique bien défini aussi bien en ce qui concerne sa nature protéique que ses activités enzymatiques. La pepsine cristallisée nous semble, à l'heure actuelle, répondre le mieux à ces conditions. L'électrophorèse a permis à un grand nombre d'auteurs [46] d'y distinguer quatre fractions de mobilité différente. MERTEN et Coll. [34] ont isolé par électrophorèse sur papier une première fraction protéique homogène, très mobile, douée d'une activité purement pepsique, et une deuxième fraction sans doute hétérogène, possédant à la fois une activité pepsique et une activité comparable à celle des catheptases (pH optimum compris entre 3.5 et 4). POPE et STEVENS [39] utilisant comme substrat l'hémoglobine parviennent à mettre en évidence sept activités enzymatiques et à isoler une fraction homogène de pH optimum d'action 1,3. Il est à remarquer que l'expression graphique de l'activité enzymatique en fonction du pH, des fractions homogènes isolées par ces deux groupes de chercheurs, est constituée par une courbe en cloche. Ces expériences viennent donc confirmer les recherches de BUCHS [8] qui signala en 1949 l'existence de deux enzymes protéolytiques dans la pepsine. Il semble donc à l'heure actuelle qu'au moins deux activités sont présentes dans la pepsine cristallisée, la première vers pH 2.0 attribuable à la pepsine, l'autre vers pH 3.5 - 4.0 doit être attribuée à une cathepsine associée.

La comparaison des résultats obtenus lors de l'étude de la pepsine cristallisée par les techniques antérieurement proposées et ceux obtenus à l'aide d'une nouvelle méthode doit permettre de préciser la valeur de cette dernière.

OBJET DU TRAVAIL

De notre brève introduction, il ressort essentiellement qu'il y aurait intérêt à mettre au point une technique permettant l'étude des enzymes protéolytiques par la détermination du substrat non attaqué en un instant donné de la protéolyse. Une telle méthode ferait appel à un réactif de déprotéinisation spécifique de la protéine intacte autre que l'acide trichloracétique.

Le but de notre travail a consisté à élaborer une technique basée sur l'emploi de l'acide phytique. Nous avons adopté comme substrat la globine de bœuf, protéine globulaire que l'on peut préparer en quantité abondante, dans un état de pureté satisfaisant et qui est soluble dans une gamme étendue de pH.

Dans une première partie de nos recherches, nous avons comparé en fonction du pH la solubilité de la globine, ainsi que sa précipitation par l'acide phytique et par l'acide trichloracétique afin de préciser les conditions de pH nécessaires à une insolubilisation totale du substrat.

Ces données acquises nous avons comparé les précipitations du substrat par l'acide phytique et l'acide trichloracétique lorsque la globine se trouve accompagnée de ses produits de dégradation enzymatique obtenus par l'action de la pepsine, de la pancréatine et de la papaïne.

Ayant montré la spécificité de l'acide phytique en tant qu'agent de déprotéinisation, nous avons proposé une technique permettant de caractériser les enzymes protéolytiques présents dans un mélange complexe par leurs pH optimum d'action. Nous avons appliqué cette méthode à l'étude de la pepsine cristallisée, enzyme dont la connaissance des activités enzymatiques est à l'heure actuelle la mieux connue.

On trouvera dans notre thèse la description de nos expériences ainsi que celle des techniques analytiques auxquelles nous avons fait appel.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

RÉACTIFS ET TECHNIQUES ANALYTIQUES

Il nous a paru souhaitable, avant d'exposer nos résultats expérimentaux de rassembler la description des facteurs qui sont demeurés constants tout au long de notre travail : c'est-à-dire les réactifs et les techniques analytiques que nous avons utilisés. Nous devrons en effet, afin de standardiser nos recherches, nous fixer un certain nombre de points relatifs au substrat protéique sur lequel nous devrons faire agir les protéases, à la composition de milieux réactionnels tamponnés à divers pH, à la composition des réactifs déféquants (solution d'acide phytique et solution d'acide trichloracétique), aux techniques analytiques nous permettant de doser l'azote protéique et le phosphore contenus dans les combinaisons de l'acide phytique et du substrat, et enfin à la détermination colorimétrique des substances protidiques provenant du substrat hydrolysé. Nous étudierons successivement ces différents points.

A. — SUBSTRAT : PREPARATION DE LA GLOBINE

Le substrat doit consister en une substance protéique pouvant se préparer en quantité abondante dans un état de pureté satisfaisant et soluble dans une gamme étendue de pH. Notre choix s'est porté sur la globine de bœuf qui nous a paru répondre le mieux à ces conditions. Nous l'avons préparée selon le procédé décrit par ANSON et MIRSKY [1].

Les hématies de bœuf sont recueillies par centrifugation du sang citraté. Elles sont lavées à l'eau physiologique puis laquées

par addition d'eau distillée (trois fois le volume des hématies). Cette liqueur est additionnée du dixième de son volume d'éther et abandonnée une nuit au réfrigérateur à 4° C. Les stromas globulaires sont éliminés par centrifugation puis par filtration sur ouate de cellulose. La solution d'hémoglobine ainsi obtenue est refroidie dans un bain de glace et est additionnée de son volume de solution décinormale d'acide chlorhydrique. Cette liqueur est alors versée goutte à goutte sous agitation mécanique dans dix fois son volume d'acétone chlorhydrique (acétone additionnée du centième de son volume de solution normale d'acide chlorhydrique). L'acétone chlorhydrique étant refroidie au bain de glace, la globine précipite sous forme de son chlorhydrate. Elle est recueillie par filtration, lavée à l'acétone anhydre froide et séchée dans un exsicateur à vide sur anhydride phosphorique. Elle se présente sous forme d'une poudre fine, très légèrement colorée, assez facilement soluble dans l'eau. Elle ne contient que de faibles quantités de sels minéraux, et se conserve bien.

Nous l'avons utilisée en solution acide (pH : 2,5) à raison de 6 g. de globine dans 100 ml. d'eau. Nous l'avons dénaturée selon les indications de DESNUELLE et Coll. [14], en chauffant pendant 5 minutes cette solution au bain-marie bouillant.

B. — MILIEU REACTIONNEL TAMPONNE

Nous avons cherché à constituer des milieux tamponnés à l'aide de solutions dont les constituants n'influeraient en rien sur l'activité des enzymes protéolytiques. Nous avons pour cela adopté les solutions tampons universelles proposées par BRITTON et ROBISON [7]. Les différents milieux sont réalisés en additionnant à un volume déterminé d'une solution acide renfermant les acides phosphorique, acétique et borique, des volumes convenables d'une solution cinquième normale de soude.

La solution acide a la composition suivante :

Acide phosphorique	3,92 g.
Acide acétique	2,40 g.
Acide borique	2,48 g.

dissous dans 1.000 ml. d'eau distillée. Cette solution correspond à une solution 0,04 M de chacun de ces acides.

Nous avons rassemblé dans le tableau II les volumes de solution cinquième normale de soude à ajouter à 40 ml. de la solution acide afin d'obtenir des solutions tamponnées allant de pH 1,81 à pH = 11,98.

TABLEAU II

Solution tampon de BRITTON et ROBISON :
quantisés de solution 0,2 N de soude à ajouter à 40 ml.
de solution acide pour obtenir des solutions à différents pH

pH	NaOH 0,2 N (en ml)	pH	NaOH 0,2 N (en ml)	pH	NaOH 0,2 N (en ml)	pH	NaOH 0,2 N (en ml)
1,81	0	4,35	11	7,00	21	9,91	31
1,89	1	4,56	12	7,24	22	10,38	32
1,98	2	4,78	13	7,54	23	10,88	33
2,09	3	5,02	14	7,96	24	11,20	34
2,21	4	5,33	15	8,36	25	11,40	35
2,36	5	5,72	16	8,69	26	11,58	36
2,56	6	6,09	17	8,95	27	11,70	37
2,87	7	6,37	18	9,15	28	11,82	38
3,29	8	6,59	19	9,37	29	11,92	39
3,78	9	6,80	20	9,62	30	11,98	40
4,10	10						

C. — REACTIFS DEFEQUANTS

Nous avons préparé deux solutions de réactifs déféquants : un réactif phytique, le second trichloracétique.

1) Réactif phytique

Ce réactif est constitué par une solution 0,1 M d'inositohexaphosphate de sodium PM = 924) cristallisé avec 35 molécules d'H_2O. La solution est obtenue en faisant dissoudre 16,05 g. de ce sel dans 100 ml. d'eau.

2) Réactif trichloracétique

Ce réactif contient 20 g. d'acide trichloracétique pour 100 ml. de solution.

D. — DOSAGE DE L'AZOTE PROTEIQUE

Nous avons effectué le dosage de l'azote protéique par microkjeldahl après minéralisation sulfurique en présence du mélange minéralisateur de DUMAZERT et MARCELLET [15] par distillation dans un appareil de PARNAS et WAGNER selon les indications de NICLOUX. Cette méthode permet d'effectuer le dosage de l'azote protéique sur une prise d'essai apportant 1 ml d'azote environ avec une précision de ± 0,5 %.

E. — DOSAGE DU PHOSPHORE

Le phosphore est amené à l'état d'acide ortho-phosphorique par minéralisation, l'acide phosphorique est alors dosé par la méthode colorimétrique de FLEURY et LECLERC [16]. Le dosage s'effectue donc en deux temps : minéralisation et dosage colorimétrique. Nous décrirons en détail les deux étapes nécessitées par cette technique.

a) Minéralisation

Nous nous sommes inspirés du procédé proposé par DELSAL et MANHOURI [13] qui consiste à traiter la prise d'essai par de l'acide sulfurique et du perhydrol. Puis nous avons détruit l'excès de perhydrol à l'aide de permanganate de potassium. Nous avons éliminé l'ion permanganique à l'aide d'acide oxalique et décomposé ce dernier réactif par chauffage au bain-marie bouillant. Le mode opératoire pour l'ensemble de ces manipulations est le suivant :

On place dans un tube à essai en pyrex successivement : une prise d'essai apportant de 200 à 500 mg. de phosphate, 0,5 ml. de solution 9 N d'acide sulfurique. On évapore jusqu'à obtention d'un volume de 0,3 à 0,4 ml. environ. On laisse refroidir et on ajoute 4 à 5 gouttes de perhydrol (eau oxygénée à 110 volumes), on chauffe doucement à l'aide d'une lampe infra-rouge pendant quinze minutes. On laisse refroidir et on ajoute quelques gouttes de perhydrol. On chauffe à nouveau 25 minutes. Cette opération est renouvelée jusqu'à ce que le résidu de minéralisation demeure incolore lorsque l'on voit apparaître de faibles vapeurs blanches d'anhydride sulfurique. On ajoute, après avoir laissé refroidir, 10 ml. d'eau, puis 1 à 11 gouttes de solution saturée de permanganate de potassium. On porte au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. On détruit alors l'excès de permanganate par addition de la quantité juste nécessaire de solution à 10 % d'acide oxalique. On porte à nouveau au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. On laisse refroidir. La liqueur est amenée, avec les eaux de lavage du tube à 25 ml. dans un ballon jaugé. C'est sur 5 ml. de cette liqueur que sera effectué le dosage colorimétrique.

b) Dosage colorimétrique

Le dosage colorimétrique a été préconisé par FLEURY et LECLERC [16] et utilise le réactif nitro-vanado-molybdique de MISSON. Le principe consiste à développer la coloration jaune d'un complexe ammoniacal dont la formule proposée est :

$$PO_4\ (NH_4)_3\ VO_3\ (NH_4)_{16}MoO_3$$

Le réctif nitro-vanado-molybdique de MISSON est préparé à partir de deux solutions dont les compositions sont les suivantes :

(1) — molybdate d'ammonium ..... 10 g.
— solution concentrée d'ammoniaque .. 1 ml.
— eau distillée q.s.p. ..... 100 ml.
(2) — vanadate d'ammonium ..... 0 g. 235

dissous à chaud dans 40 ml. d'eau distillée. On laisse refroidir, on verse lentement dans cette solution 1 ml. de solution d'acide nitrique de = 1,33 et on porte à 100 ml.

Le réactif de MISSON est obtenu en mélangeant les deux liqueurs précédentes, en ajoutant 67 ml. d'acide nitrique de d = 1,38 et en complétant le volume à 500 ml.

Le dosage du phosphore s'effectue en mélangeant un volume de solution phosphorique à un volume égal de réactif de MISSON. L'intensité de l'absorption de la coloration est déterminée au spectrophotomètre pour une longueur d'onde de $\lambda = 4.500$ Å et sous une épaisseur de 2 cm. On se réfèrera à une courbe d'étalonnage de l'appareil obtenue dans les mêmes conditions, à l'aide de dilutions convenables d'une solution-étalon constituée par la dissolution de 1,915 g. de phosphate monopotassique dans un litre d'eau distillée, cette solution renferme 1 mg. de P_2O_5 par ml. soit 0,465 mg. de phosphore. Cette méthode permet ainsi de doser de 50 µg. à 200 µg. de phosphore avec une précision de ± 2 %.

F. — DOSAGE DES SUBSTANCES PROTEIQUES PAR LE PROCEDE DE LOWRY, ROSEBOURG, FARR ET RANDALL [32]

Il nous a paru intéressant de doser, après élimination du substrat intact, les produits de dégradation de la globine par les protéases à l'aide d'une méthode rapide, pouvant être pratiquée sur des prises d'essai réduites. Bien que moins précise et moins spécifique que le dosage de l'azote effectué par micro-kjeldahl, nous avons pensé qu'elle nous apporterait, néanmoins, des renseignements intéressants sur l'évolution des protéolyses. Nous avons choisi pour cela la méthode colorimétrique proposée par LOWRY et Coll. [32] basée sur le développement d'une coloration bleue obtenue par l'action des substances contenant de la tyrosine sur le réactif phospho — 18 — tungsto — molybdique de FOLIN et CIOCALTEU.

Les réactifs utlisés pour réaliser le dosage sont les suivants :

Réactif A :
— carbonate anhydre de sodium ..... 2 g.
— solution de soude 0,1 N, q.s.p. ..... 100 ml.

Réactif B :

— Sulfate de cuivre cristallisé (SO_4Cu, 5 OH_2) ..... 0,5 g.
— tartrate double de sodium et potassium.. 1 g.
— eau distillée q.s.p ..... 100 ml.

Réactif C :

— Réactif A ..... 50 ml.
— Réactif B ..... 1 ml.

Ce réactif doit être préparé extemporanément car il ne se conserve que 24 heures.

Réactif D :

Réactif de FOLIN et CIOCALTEU : dans un ballon rodé et à fond rond de 750 ml. on met :

— Tungstate de sodium ..... 20 g.
— Molybdate de sodium ..... 5 g.

on fait dissoudre dans 140 ml. d'eau distillée, on ajoute :

— acide phosphorique concentré ..... 10 ml.
— acide chlorhydrique ..... 20 ml.

on chauffe à l'ébullition sous réfrigérant à reflux pendant 10 heures, on ajoute alors :

— sulfate de lithium ..... 30 ml.
— eau distillée ..... 10 ml.
— brome : quelques gouttes pour avoir une coloration jaune.

On fait bouillir à l'air libre pendant 15 minutes pour chasser le brome en excès. On laisse refroidir. On porte à 200 ml. avec de l'eau distillée. Cette solution est environ deux fois normale. Après titrage par une solution 0,5 N de soude d'une fraction aliquote (5 ml.) en présence de phénol phtaléine, on ramène à la normalité acide par addition d'eau distillée.

Le réactif se conserve dans un flacon bien bouché, coloré en jaune et placé à l'abri de la lumière.

Mode opératoire

Dans un tube à hémolyse, on introduit une prise d'essai d'un volume fixe de 1 ml. On y ajoute 5 ml. de réactif C et on agite. On attend 12 minutes et on ajoute rapidement 0,5 ml. de réactif D. On agite énergiquement. On laisse la coloration bleue se développer exactement 30 minutes. Un essai témoin est préparé de façon identique en remplaçant la liqueur à analyser par de l'eau distillée. On lit l'intensité de la coloration au spectrophotomètre et pour une longueur d'onde de 7.500 Å sous une épaisseur de 1 cm. On se rapporte à une courbe d'étalonnage établie à l'aide d'une solution titrée de tyrosine. La méthode permet ainsi de doser de 10 à 100 µg de cet amino-acide avec une précision de ± 2 %. Les résultats sont donc exprimés arbitrairement en tyrosine.

CHAPITRE II

SUR LA SOLUBILITÉ DE LA GLOBINE EN FONCTION DU pH EN L'ABSENCE OU EN PRÉSENCE D'ACIDE PHYTIQUE OU TRICHLORACÉTIQUE

Après avoir décrit les principales techniques analytiques nécessaires à notre travail, il convient de préciser certaines propriétés du substrat choisi, en l'espèce la globine : en particulier la solubilité de cette protéine en fonction du pH du milieu. Il était également important pour la suite de notre travail de déterminer quels étaient les pH correspondant à une insolubilisation complète du substrat lorsque celui-ci est mis en présence des réactifs déféquants que nous désirons étudier : acide phytique et acide trichloracétique. C'est pourquoi nous décrirons maintenant nos recherches relatives :

— à la solubilité de la globine dénaturée en fonction du pH ;

— à la précipitation de cette protéine par l'ion phytique en fonction du pH ;

— à la précipitation de la globine par l'ion trichloracétique en fonction du pH.

Ces différentes recherches nous ayant apparu comme indispensables pour nous mettre à l'abri de toute cause d'erreur pouvant être due à des variations de la concentration en ion hydrogène dans le milieu de défécation.

I. — ETUDE DE LA SOLUBILITE DE LA GLOBINE DENATUREE EN FONCTION DU pH

Cette première partie de nos recherches a consisté à déterminer la quantité de globines restant en solution dans les liqueurs tamponnées à pH différents. On sait que cette valeur est fonction du rapport existant entre la quantité de protéine et le volume de la solution mise en œuvre, ainsi que de la température et de la force ionique du milieu (GREEN).

Aussi nous nous sommes fixé tout d'abord deux grandeurs : la quantité de globine (30 mg.) et le volume final (30 ml.) de chaque essai.

Nous avons alors réalisé l'expérience de la manière suivante :

Dans une série d'erlenmeyers de 50 ml. de capacité, nous plaçons successivement 5 ml. de solution acide de BRITTON et ROBISON, 1 ml. de solution de globine à 6 % (correspondant à 7,44 g. d'azote protéique par ml.). Puis dans chaque essai, nous mettons des volumes de solution normale de soude afin d'obtenir différents pH (de pH = 4.5 à pH = 10). Le volume final est amené à 30 ml. avec de l'eau distillée. Nous portons les essais au réfrigérateur à + 4° C pendant une heure. Puis nous filtrons une fraction de chaque essai ; l'autre fraction est abandonnée à la température du laboratoire, l'équilibre de température ayant été atteint. Nous avons déterminé les différents pH. Pour 5 ml. de chaque filtrat, nous dosons l'azote protéique et rapportons cette détermination au volume total, soit 30 ml.

Afin de rendre nos résultats comparables, nous les avons exprimés en % de protéine restant en solution, ce que nous avons calculé en multipliant par 100 le rapport de la quantité d'azote protéique en solution (n) à celle de l'azote protéique total mis en jeu (N). Le % de protéine en solution dans les conditions opératoires que nous venons de définir est égal à $\frac{n}{N} \times 100 = X$.

Les résultats de cette expérience ont été rassemblés dans le tableau III dans lequel on trouvera les valeurs des pourcentages de globine restant en solution à différents pH. Ces résultats se trouvent également exprimés sous forme de graphique dans la figure N° 1.

TABLEAU III

Valeur des pourcentages de globine restant en solution, à différents pH (pour un milieu contenant initialement 0,2 g. pour 100 m³ de globine)

pH	%
9.45	100
9.10	63
8.90	48
8.40	28
8.10	14
7.70	15
7.00	18
6.50	21
6.15	33
5.60	67
5.15	100
4.50	100

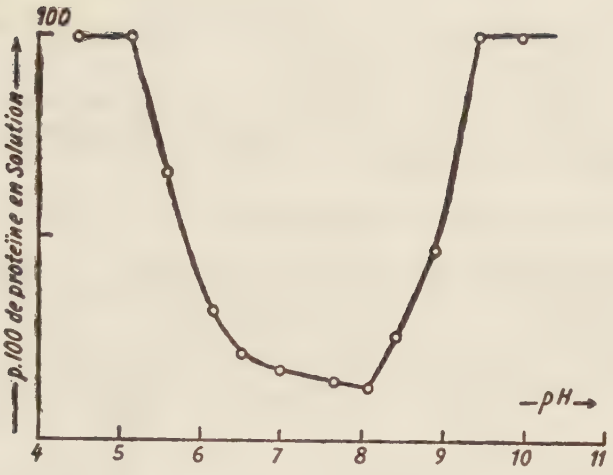

FIGURE 1

Solubilité de la globine exprimée en pourcentage de protéine demeurant en solution en fonction du pH du milieu (Solution contenant initialement 0,2 gr. pour 100 ml de globine dénaturée.)

L'examen du tableau et de la courbe montre que dans les conditions opératoires dans lesquelles nous nous sommes placée, la globine dénaturée demeure parfaitement soluble pour les pH inférieurs à 5,2 et supérieurs à 9,5 et elle présente une zone de moindre solubilité entre ces deux valeurs avec une zone de solubilité minima pour les pH compris entre 7 et 8. Le point isoélectrique de la globine dénaturée serait très voisin de pHi = 8.10 (BŒUF).

II. — ETUDE DE LA PRECIPITATION DE LA GLOBINE PAR L'ACIDE PHYTIQUE EN FONCTION DU pH

Cette recherche a été effectuée dans le but de déterminer les valeurs de pH pour lesquelles l'acide phytique donne avec la globine une combinaison insoluble. Nous avons étudié au cours de cette expérience l'influence du pH sur la solubilité du complexe donné par la globine avec l'acide phytique. Nous avons fixé la concentration en ion phytique de sorte que les milieux tamponnés correspondent à une solution 0,01 M de cet acide. Nous avons adopté un protocole d'essai analogue à celui précédemment décrit. Il n'en diffère que par le fait que 3 ml. de solution 0,1 M de phytinate de sodium entrent dans la composition de chaque essai. Le volume final et la concentration en globine demeurant identiques.

Nous avons abandonné les essais à + 4°C pendant une heure. Puis sur une fraction de chaque essai, nous déterminons le pH après équilibre avec la température ambiante. Une deuxième

fraction a été filtrée et sur une partie aliquote nous avons dosé l'azote protéique par micro-kjeldahl.

Les résultats sont exprimés comme précédemment. Ils sont rassemblés dans le tapleau n° IV et représentés graphiquement par la courbe de la figure n° 2.

TABLEAU IV

Valeur du pourcentage de globine restant en solution, à différents pH en présence d'acide phytique 0,01 M.

pH	%
8.95	100
7.90	40
7.00	11,4
6.50	5
4.30	0,8
3.45	0
3.05	0
2,60	0
2.40	0
2.30	0
2.20	0,08
2.10	27,6

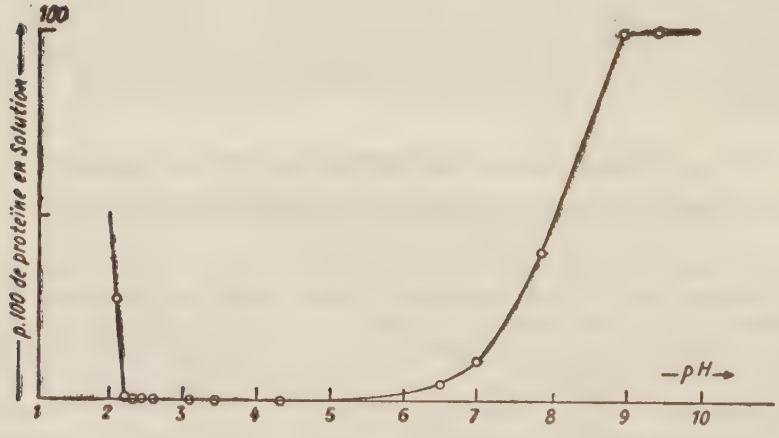

FIGURE 2

Solubilité de la globine en présence d'acide phytique (0,01 *M*) *exprimée en pourcentage de protéine restant en solution*

L'examen du tableau et du graphique montre que la globine dénaturée est complètement insolubilisée de pH 5 à pH 2,2 ; pour les pH inférieurs à cette dernière valeur ainsi que pour les pH compris entre 5 et 8,9, une certaine quantité de globine demeure en solution, alors que pour les pH supérieurs à 8,9 la globine n'est

en aucune façon insolubilisée par le réactif phytique dans nos conditions opératoires.

III. — ETUDE DE LA PRECIPITATION DE LA GLOBINE PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE EN FONCTION DU pH

Nous avons également recherché les valeurs des pH pour lesquelles l'acide trichloracétique insolubilise complètement la globine. Le principe de l'expérience est analogue à celui relatif à l'acide phytique à ceci près que nous avons adopté une concentration finale du réactif déféquant égale à 10 %, valeur la plus communément adoptée.

Le protocole, dans cette série d'essai, ne diffère de celui décrit dans l'expérience précédente qu'en fonction du fait que dans la composition du milieu réactionnel entrent 15 ml. de solution d'acide trichloracétique, à 20 %, le volume final et la concentration en globine restant les mêmes. Nous avons porté les essais à + 4° C puis nous avons déterminé sur une fraction les différents pH. Sur une partie aliquote provenant de la filtration d'une deuxième fraction nous avons dosé l'azote protéique soluble par microkjeldahl.

Les résultats sont exprimés comme précédemment et rassemblés dans le tableau n° V et le graphique de la figure n° 3.

TABLEAU V

Valeur des pourcentages de globine restant en solution, à différents pH, en présence d'acide trichloracétique

pH	%
10.9	100
10.7	100
9.5	83
8.7	60
8.0	37
6.6	17
6.5	16
5.4	3
4.4	1
2.5	0
2.35	0
2.30	0
2.20	0

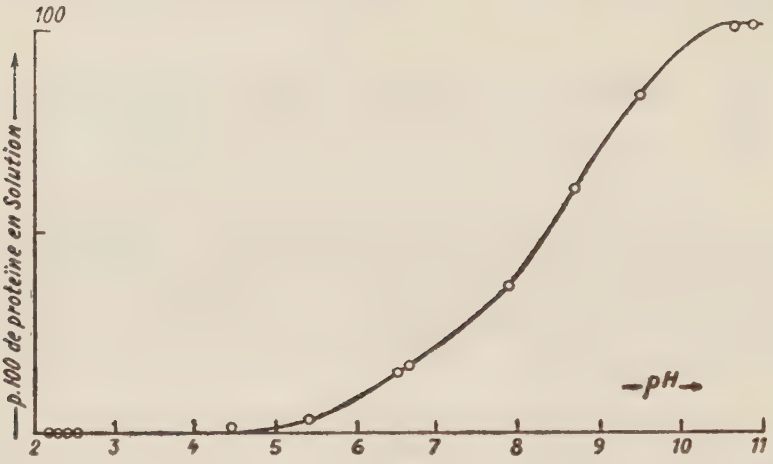

FIGURE 3

Solubilité de la globine en présence d'acide trichloracétique (solution à 10 %) exprimée en pourcentage de protéine restant en solution

L'examen de ce tableau et de la courbe montre que l'acide trichloracétique à la concentration de 10 % précipite la totalité de la protéine en solution pour les pH inférieurs à 4.4. On n'assiste à aucun phénomène de redissolution pour les pH plus bas ; aucune précipitation de la protéine n'est observée au-dessus de pH = 10.5.

CHAPITRE III

COMPARAISON ENTRE LES DEPROTÉINISATIONS PHYTIQUE ET TRICHLORACETIQUE

Les recherches que nous venons de décrire nous ont permis de déterminer les valeurs des pH permettant l'insolubilisation de la globine par les acides phytique et trichloracétique. Il s'agit maintenant d'étudier comparativement le comportement de ces deux réactifs déprotéinisants sur la précipitation de la globine en présence de ses produits de dégradation enzymatique. Cette partie de nos recherches nous a paru fondamentale car elle doit permettre d'établir si un de ces réactifs présente une supériorité vis-à-vis de l'autre.

Dans ce but, nous avons réalisé deux séries d'expériences.

Tout d'abord, nous avons préparé un certain nombre de protéolysats en faisant agir sur la globine divers enzymes : pepsine, pancréatine, papaïne. Les protéolysats ont été déféqués par l'acide phytique dans les conditions précédemment établies (pH et concentration d'acide) afin d'obtenir une précipitation totale du substrat protéique demeuré intact. Nous avons analysé les différents précipités obtenus dans chaque cas et nous avons déterminé leurs teneurs en azote protéique et en phosphore phytique. Les travaux de COURTOIS et Coll. [2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12] ont montré que pour une protéine donnée, le rapport P/N de la quantité de phosphore phytique à celle de l'azote de la protéine est constant et est en relation avec sa teneur en groupements aminés libres. On pouvait donc admettre que si l'analyse des précipités obtenus à des temps différents d'une protéolyse montre un rapport P/N égal à celui d'un précipité de phytate de globine, seule la protéine non dégradée se trouve présente dans la combinaison insoluble. Si tel est le cas, nous pensons pouvoir montrer la spécificité de l'acide phytique vis-à-vis du substrat protéique. On conçoit alors qu'il ne sera plus nécessaire de doser le phosphore et l'azote dans les

précipités ; il suffira de déterminer par une méthode convenablement choisie l'azote protidique des filtrats de déprotéinisation.

Nous nous sommes proposé, dans une deuxième série d'expériences, de comparer les teneurs en azote protidique des filtrats de déprotéinisation phytique et trichloracétique d'un même protéolysat de globine obtenu avec la pepsine, la pancréatine ou la papaïne. Si les dosages effectués nous montrent une différence notable entre ces deux types de défécation, c'est que l'acide trichloracétique présente un caractère de spécificité vis-à-vis du substrat protéique, moindre que celui de l'acide phytique.

Nous étudierons successivement les deux parties de nos recherches :

I. — ETUDE DE LA VALEUR DU RAPPORT P/N DES PRECIPITES PHYTIQUES OBTENUS A DES TEMPS DIFFERENTS DE LA PROTEOLYSE DE LA GLOBINE PAR LA PEPSINE, LA PANCREATINE, LA PAPAINE

Avant d'entreprendre ces expériences, il était nécessaire de déterminer la valeur du rapport P/N d'un précipité de phytate de globine. Pour cela nous avons réalisé l'expérience suivante :

Dans un tube à centrifuger contenant 1 ml. de solution M/10 de phytinate de sodium, un volume d'acide chlorhydrique déterminé préalablement et permettant d'obtenir un pH final de 2,4, la quantité d'eau distillée nécessaire afin d'amener cette liqueur à 19 ml., on place 1 ml. de solution à 3 % de globine dénaturée. On abandonne le tube ,après avoir soigneusement mélangé, au réfrigérateur à + 4° C pendant 1 heure. On centrifuge. On recueille le liquide surnageant et on égoutte soigneusement le tube par retournement sur un papier filtre.

Ici se présente une difficulté d'ordre analytique due au fait que le précipité de phytate ne peut être lavé. Aussi faut-il introduire des corrections en tenant compte de la quantité de phosphore apportée par le liquide qui imprègne le précipité et qui mouille les parois du tube et dont il importe de déterminer le volume. Pour cela, on peut admettre que le poids du volume de liqueur que l'on cherche à déterminer est égal au poids de l'eau que l'on peut déterminer. Après dessiccation du tube et du précipité, la densité de la liqueur surnageant étant voisine de l'unité, on peut, par ce procédé, déterminer le volume de la solution d'imbibition.

L'analyse du précipité comprendra donc plusieurs temps. Il sera nécessaire tout d'abord de peser le tube qui contient le précipité avant et après dessiccation, d'effectuer le dosage du phosphore sur la liqueur surnageante, et enfin, après dissolution du

précipité dans 5 ml. de soude normale, de doser le phosphore et l'azote protéique sur cette liqueur. Les dosages de ces deux éléments sont effectués sur des prises d'essais convenables par les méthodes analytiques déjà décrites.

Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau VI. Nous avons donné à titre d'exemple, les résultats relatifs à la détermination de l'eau d'imbibition du précipité (E) au phosphore dosé dans le tube sec (P), au phosphore apporté par la liqueur d'imbibition (p) ainsi qu'aux valeurs du phosphore réellement contenu dans le précipité phytique (P — p). Les résultats sont relatifs également aux quantités d'azote (N) dosées dans le tube sec. Ces diverses valeurs nous ont permis de calculer les valeurs $\frac{P - p}{N}$ ou $\frac{P}{N}$ corrigé. Disons également que nous avons pu constater que les liqueurs surnageantes contiennent aux erreurs expérimentales près : 1,90 mg. de phosphore pour 1 ml., ce qui est en accord avec le fait que la déprotéinisation est effectuée en présence d'un très grand excès d'acide phytique.

TABLEAU VI

Détermination de la valeur du rapport de l'azote au phosphore (P/N) du précipité de phytinate de globine

Eau d'imbibition du précipité et du tube (en g.) = E	Phosphore dosé dans le tube sec (en mg.) = P	Phosphore apporté par la liqueur d'imbibition (en mg.) = p	Azote dosé dans le précipité (en mg.) = N	P/N corrigé $\frac{P - p}{N}$ =
0,107	1,183	0,203	3,22	0,30
0,086	1,220	0,168	3,26	0,32
0,112	0,983	0,213	2,59	0,30

De l'examen de ce tableau, il ressort que le rapport P/N du précipité de phytate de globine est égal à 0,31 ± 1.

Cette donnée analytique acquise nous avons pu entreprendre l'étude de la valeur du rapport P/N des précipités phytiques recueillis au cours de la dégradation de la globine par différents enzymes protéolytiques.

Les solutés enzymatiques utilisés sont les suivants :

— Solution de 0,1 g. de pepsine de titre 50 en solution dans 100 ml. d'eau physiologique.

— Solution de 0,75 g. de pancréatine officinale dans 100 ml. d'une solution à 0,3 % de carbonate de sodium.

— Solution de 0,3 g. de papaïne (UCLAF) dans 100 ml. de solution 0,01 N d'acide acétique contenant 12,4 mg. de sulfure de sodium pour assurer l'activation.

Nous avons opéré en ajoutant 10 ml. de solution enzymatique à 50 ml. de solution de globine à 3 % ajustée aux pH optima d'action de l'enzyme que l'on désire étudier, à savoir :

— pH : 2.5 pour la pepsine ;

— pH : 10 pour la pancréatine ;

— pH : 4,7 pour la papaïne.

La protéolyse est suivie en effectuant toutes les 15 min. des prélèvements destinés à la déprotéinisation par l'acide phytique. Pour cela on mesure dans un tube à centrifuger 2 ml. d'une solution 0,1 M de phytate de sodium, puis la quantité nécessaire de solutoin 0,2 N d'acide chlorhydrique pour amener à 2,4 le pH du mélange final. On complète à 18 ml. avec de l'eau distillée et on ajoute 2 ml. de protéolysat. Le mélange est porté 1 heure au réfrigérateur à + 4° C. On conduit l'analyse du précipité comme il a été dit précédemment dans le cas de la détermination du rapport P/N du phytinate de globine. Les corrections à apporter ici seront relatives aux quantités de phosphore et d'azote contenues dans la liqueur d'imbibition, ce qui conduit au dosage de ces deux éléments dans la liqueur surnageante.

Le tableau n° VII résume les résultats de nos expériences et contient les valeurs du rapport P/N corrigé des précipités de déprotéinisation phytique obtenue à des temps différents de la protéolyse de la globine par la pepsine, la pancréatine ou la papaïne.

De l'examen des résultats contenus dans ce tableau, il ressort que l'acide phytique ajouté à des protéolysats pepsique pancréatique ou papaïnique, provoque la formation d'un précipité de moins en moins abondant, entraînant des quantités décroissantes de substrat au fur et à mesure de la poursuite de la protéolyse. Dans tous les cas, les teneurs en azote et en phosphore des précipités sont dans un rapport P/N qui demeure constant aux erreurs expérimentales près et égal à celui qui caractérise la globine soit P/N = 0,31.

En conclusion, nous pensons avoir ainsi démontré que l'acide phytique peut être considéré comme un réactif spécifique de la précipitation de la globine intacte, même lorsqu'elle est accompagnée de ses produits de dégradation par les enzymes protéolytiques.

TABLEAU VII

Valeurs du rapport P/N des précipités de déprotéinisation phytique obtenue à des temps différents de la protéolyse de la globine par la pepsine, la pancréatine ou la papaïne

Enzyme	Temps d'hydrolyse (en minutes)	Valeurs corrigées du phosphore (en mg./ml. de protéolysat)	Valeurs corrigées de l'azote (en mg./ml. de protéolysat)	Valeur du rapport P/N
Pepsine	0	0,77	2,59	0,30
	15	0,64	2,15	0,30
	30	0,56	1,75	0,32
	45	0,44	1,53	0,30
	60	0,42	1,30	0,32
	75	0,39	1,15	0,33
Pepsine	0	0,90	3,00	0,30
	0	0,91	3.00	0,31
	15	0,52	1,72	0,30
	30	0,26	0,78	0,33
	45	0,19	0,60	0,31
	60	0,17	0,55	0,31
Pepsine	0	0,96	3,08	0,31
	10	0,79	2,44	0,32
	20	0,76	2,15	0,31
	30	0,55	1,90	0,29
	40	0,50	1,50	0,33
	50	0,41	1,15	0,34
	60	0,32	0,98	0,33
Papaïne	0	1,05	3,26	0,32
	10	0,86	2,65	0,32
	40	0,66	2,15	0,30
	60	0,45	1,50	0,30
	90	0,38	1,26	0,30
Pancréatine .	0	0,98	3,22	0,30
	15	0,84	2,66	0,31
	30	0,77	2,34	0,32
	45	0,63	2,00	0,31
	60	0,63	1,85	0,34
	75	0,55	1,76	0,31

II. — ETUDE COMPAREE DES DEPROTEINISATIONS PAR L'ACIDE PHYTIQUE ET PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE DES PROTEOLYSATS ENZYMATIQUES DE GLOBINE

L'acide phytique pouvant être maintenant considéré comme précipitant spécifiquement la globine en présence de ses produits de dégradation protéasique, on conçoit qu'il ne sera plus nécessaire de doser le phosphore et l'azote dans les précipités de phytate de protéine : il suffira de doser, par une méthode convenablement choisie, l'azote protidique dans les filtrats de déprotéinisation. C'est ce que nous avons fait, soit par la méthode de kjeldahl, soit par la microméthode colorimétrique de LOWRY et Coll. au cours des expériences suivantes. Nous nous sommes tout d'abord proposé de comparer les teneurs en azote protidique des filtrats de déprotéinisation phytique et trichloracétique d'un même protéolysat de globine obtenu avec la pepsine, la pancréatine ou la papaïne.

La protéolyse, suivie en fonction du temps, et la déprotéinisation phytique sont effectuées comme dans les expériences précédentes. La défécation par l'acide trichloracétique est réalisée en ajoutant 2 ml. d'une solution à 20 % de cet acide à 2 ml. de protéolysat ; on agite et abandonne une heure au réfrigérateur, on filtre. On prélève 2 ml. de filtrat phytique ou de filtrat trichloracétique que l'on neutralise par addition de 2 ml. d'une solution N de soude et sur des fractions aliquotes de ces liqueurs, on procède au dosage colorimétrique selon la technique de LOWRY et Coll. Dans ce cas, les résultats sont exprimés conventionnellement en mg. de tyrosine pour 1 ml. de protéolysat (à cette occasion, la technique de LOWRY et Coll. a été étalonnée à partir de solutions de titre connu de tyrosine pure). Par ailleurs, dans le but de définir d'une façon précise le degré de protéolyse, à chaque instant, nous avons dosé l'azote présent dans les filtrats phytiques par micro-kjeldahl. Les résultats sont alors exprimés en pourcentage d'hydrolyse calculé en faisant le rapport, multiplié par cent ,de la quantité d'azote non précipitée par l'acide phytique à celle de l'azote total d'un même volume de protéolysat.

Nous avons rassemblé dans le tableau n° VIII les résultats relatifs à ces expériences. On y trouve les quantités de substances protéiques (exprimées en mg. de tyrosine) présentes dans les filtres de déprotéinisats phytiques et trichloracétiques à divers instants de la protéolyse. Nous rappelons que ces résultats sont relatifs au filtrat correspondant à 1 ml. de protéolysat. Nous avons également placé dans ce tableau les valeurs des pourcentages d'hydrolyse de la globine pour les différents enzymes étudiés.

TABLEAU VIII

Etude comparée des déprotéinisations par l'acide phytique et par l'acide trichloracétique en fonction du temps de protéolyse (ou du pourcentage d'hydrolyse) de la globine par la pepsine, la pancréatine ou la papaïne

Enzymes	Durée de la protéolyse (en minutes)	% d'hydrolyse	Substances protidiques dosées par la méthode de LOWRY et Coll. (en mg. de tyrosine par ml. de protéolysat)	
			Dans le filtrat trichloracétique	Dans le filtrat phytique
Pepsine	0	0,0	0,00	0,00
	15	11,5	0,06	0,80
	30	28,0	0,18	1,12
	45	45,0	0,20	1,50
	60	62,0	0,60	2,50
Pepsine	0	0,0	0,00	0,00
	15	18,0	0,04	0,58
	30	28,0	0,10	0,57
	45	46,0	0,20	2,20
	60	65,0	0,38	2,40
Pancréatine	0	0,00	0,00	0,00
	15	21,0	0,38	0,60
	30	42,0	0,74	1,88
	45	60,0	1,01	2,24
	60	67,5	1,19	2,60
	90	80,0	1,34	2,88
Pancréatine	0	0,00	0,00	0,00
	15	17,0	0,44	0,60
	30	27,0	0,91	1,80
	45	44,0	0,96	2,34
	60	58,0	1,18	2,80
	75	65,0	1,32	2,90
Papaïne	0	0,00	0,00	0,00
	15	19,0	0,22	0,92
	30	34,5	1,23	2,64
	45	54,0	1.47	2,96
	60	61,0	1,71	3,44

La figure n° 4 illustre les résultats de notre étude cinétique comparée de la dégradation de la globine par la pepsine, par la pancréatine, et par la papaine au moyen de la déprotéinisation phytique et de la déprotéinisation trichloracétique.

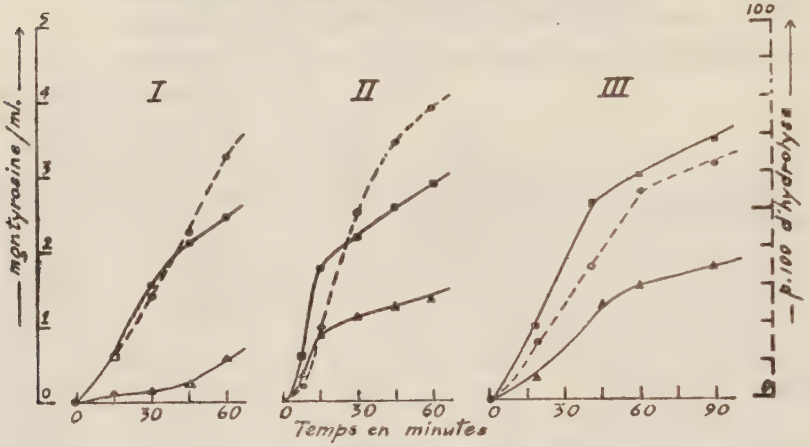

FIGURE 4

Protéolyse de la globine en fonction du temps sous l'action de la pepsine (I), *de la pancréatine* (II), *de la papaïne* (III) *étudié comparativement par le dosage des substances azotées solubles dans les filtrats de déprotéinisations phytique* (○) *et trichloracétique* (Δ) *des protéolysats. Les courbes en pointillés traduisent l'évolution de la protéolyse en pourcentage d'hydrolyse*

L'examen des résultats contenus dans le tableau n° VIII et la figure n° 4 met en évidence que quel que soit l'enzyme considéré, les protéolysats contiennent toujours, au même instant davantage de substances protidiques précipitables par l'acide trichloracétique que de substances précipitables par l'acide phytiue. Ceci confirme le fait que ce dernier précipite uniquement la globine intacte et montre que la défécation par l'acide trichloracétique insolubilise, outre cette dernière divers produits de sa dégradation par les protéases. Ce phénomène est particulièrement sensible en ce qui concerne la pepsine. On voit en effet (graphique I de la figure n° 4) qu'il n'apparaît alors en fonction du temps, que de très faibles quantités de substances dosables par la méthode de LOWRY et Coll. dans les filtrats de déprotéinisation trichloracétique des protéolysats (soit 0,60 mg. en tyrosine pour 1 ml. de protéolysat au bout de 60 minutes). Par contre, au bout de ce même temps, on observe la présence de quantités environ quatre fois plus élevées (2,45 mg.) de substances dosables par la même méthode dans les filtrats phytiques. Ce résultat est en accord avec les dosages pratiqués par micro-kjeldahl sur ces mêmes filtrats qui montrent qu'au bout de 60 minutes l'hydrolyse a transformé 65 % de la globine initiale-

ment mise en œuvre. Dans les conditions où nous nous sommes placée, nous avons donc observé l'action importante et rapide de la pepsine grâce à la déprotéinisation par l'acide phytique. Par contre, nous aurions été amenée à conclure à tort à une faible activité de cet enzyme en ne tenant compte que des résultats relatifs à l'acide trichloracétique. L'emploi de ce dernier apparaît donc comme particulièrement désavantageux du point de vue technique et susceptible de fausser l'interprétation d'expériences de ce type. Avec la pancréatine nous avons obtenu près de 78 % d'hydrolyse de la globine au bout de 60 minutes. La différence entre les quantités de substances azotées présentes, au bout de ce temps, dans les filtrats phytiques (2,85 mg) et dans les filtrats trichloracétiques (1,40 mg.) est encore nettement marquée (du simple au double). Il en est de même en ce qui concerne la papaïne ; on voit que au bout de 90 minutes, l'hydrolyse atteint 68 % environ et que la quantité d'azote du filtrat phytique (3,40 gr.) est environ le double de celle des filtrats trichloracétiques (1,75 mg.). Dans l'ensemble, nos résultats traduisent, comme on l'admet classiquement, que la pancréatine et la papaïne scindent les protéines en fragments de poids moléculaire plus faible que les produits de dégradation obtenus par la pepsine. Cette dernière conduit à des substances qui sont, pour la plus grande partie, précipitables par l'acide trichloracétique, mais non par l'acide phytique comme le montrent nos résultats. Par contre, la pancréatine et la papaïne provoquent la formation d'une quantité moindre de substances de cette dernière nature et davantage de produits ne précipitant par aucun des deux agents de déprotéinisation que nous avons étudiés.

En résumé l'ensemble de ces résultats montre que nous sommes parvenue grâce à l'emploi de l'acide phytique, à jeter les bases d'une méthode d'étude des enzymes protéolytiques fondée sur la détermination directe (ou par différence) de la quantité de substrat protéique demeuré intact à un instant donné de la protéolyse.

CHAPITRE IV

SPECTRE D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Nous avons rappelé au cours de notre introduction qu'il était possible de caractériser les enzymes isodynames présents dans une préparation complexe par leur pH optimum d'action. Dans ce but il est nécessaire de déterminer l'activité d'un tel mélange en fonction du pH. La détermination des activités doit être réalisée à l'aide d'essais aussi comparables que possible. Le graphique représentant l'activité en fonction du pH peut être considéré comme un « spectre d'activité enzymatique » de la préparation étudiée.

Les travaux de MERTEN et Coll. [34], de POPE et STEVENS [38, 39], qui ont pu isoler à partir de la pepsine des enzymes homogènes, montrent que dans cette étude de l'activité en fonction du pH, les déterminations conduisent à l'obtention d'un graphique qui est représenté par une courbe en cloche symétrique. Cette donnée permet donc de proposer une interprétation des spectres d'activité enzymatiques basée sur une analyse graphique des documents.

Disposant d'un déprotéinisant de choix nous nous sommes proposé d'établir un protocole expérimental permettant d'établir des spectres d'activités enzymatiques puis de réaliser sur ces documents une analyse graphique simple.

Au cours de la dernière partie de notre travail nous avons tout d'abord proposé une technique analytique standardisée permettant d'établir les spectres d'activités enzymatiques. Cette technique est appliquée à l'étude de la pepsine cristalline. Les résultats de l'analyse d'un document relatif à cet enzyme comparés à ceux ayant été entièrement décrits doivent permettre d'apprécier la valeur de notre méthode. Nous l'avons ensuite utilisée dans le but de déterminer le spectre d'activité enzymatique de la pancréatine. Nous donnons successivement ces deux séries d'expériences :

I. — SPECTRE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA PEPSINE CRISTALLISEE

Le protocole expérimental que nous proposons peut se diviser en deux parties. La première est relative à la protéolyse proprement dite, la seconde à la déprotéinisation phytique.

a) Protéolyse

La conduite des expériences de protéolyses doit être réalisée dans des conditions de volume, de concentrations en enzyme et en substrat définies. Nous avons adopté pour chaque essai un volume total de 30 ml. contenant 2 ml. de solution de globine à 6 %. La quantité d'enzyme est choisie de telle sorte que la moitié du substrat environ soit hydolysée au cours de l'expérience. Une étude cinétique conduite dans les conditions analogues à celle décrite au Chapitre II, permet de préciser la quantité de solution enzymatique et la durée de l'hydrolyse pour chaque enzyme étudié. Au cours des expériences que nous avons relatées nous avons utilisé une solution de pepsine cristallisée contenant 0,25 mg. de protéine pour 100 ml. d'eau physiologique.

Le mode opératoire peut se résumer ainsi :

Dans une série de tubes à essai on introduit 10 ml. de solution de BRITTON et ROBISON puis les quantités de solution de soude 0,2 N nécessaire à l'obtention des divers pH, 2 ml. de solution à 6 % de globine, le volume de solution enzymatique déterminé par l'expérience de cinétique (ici 1 ml. de la solution de pepsine) et enfin la quantité d'eau nécessaire à amener le volume final à 30 ml. On porte les tubes bouchés dans un thermostat à 37° C. pendant un temps convenable. Nous avons choisi pour cette expérience une durée de 1 heure ; une prise d'essai de 5 ml. est prélevée sur laquelle on effectuera la défécation phytique. Le reste du protéolysat sera utilisé pour contrôler le pH de chaque essai.

b) Précipitation phytique

La précipitation phytique sera réalisée en ajoutant 5 ml. du protéolysat à 5 ml. de solution 0,02 M. d'acide phytique ajusté à pH = 2.4 au moyen d'acide chlorhydrique. Cette solution est préparée de la manière suivante :

A 100 ml. de solution de phytinate de sodium 0,1 M. on ajoute, en agitant et sous contrôle de l'électrode de verre, la quantité d'acide chlorhydrique 6N nécessaire pour obtenir un pH de 2,4, on portera à 500 ml. le volume final.

Cette solution permet d'obtenir un pH final suffisamment acide pour réaliser une précipitation complète du substrat. Néan-

moins pour les protéolysats obtenus en milieu très alcalin il sera nécessaire de vérifier le pH de la précipitation phytique. Dans le cas où l'acidité ne serait pas suffisante il conviendra de préparer une solution phytique plus acide afin d'obtenir un pH = 2,4 au cours de la déprotéinisation.

La précipitation du phytinate de globine est poursuivie une heure à + 4° C. On filtre sur une prise d'essais de 5 ml. de filtrat, on dosera l'azote correspondant aux substances protidiques provenant de la dégradation de la globine, par microkjeldahl.

Les résultats seront exprimés en % d'hydrolyse calculé en correspondant au substrat dégradé et rapporté aux 30 ml. du filtrat déprotéinisé (soit n_1 déterminé par microkjeldahl × 12 = n) à l'azote N apporté par les 2 ml. de solution à 6 % de globine.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau n° IX et le spectre d'activité enzymatique construit représenté par le graphique de la figure n° 5.

TABLEAU IX

Résultats permettant d'établir
le « spectre d'activité enzymatique » de la pepsine cristallisée

pH	% d'hydrolyse
1,1	31
1,3	30,5
1,6	46
1,8	51
2,1	56
2,3	51
2,5	55
2,7	55
2,9	52
3,1	42
3,3	31
3,6	23
3,9	17
4,1	12,5
4,3	9
4,7	7
5,2	7
5,5	5
5,8	0

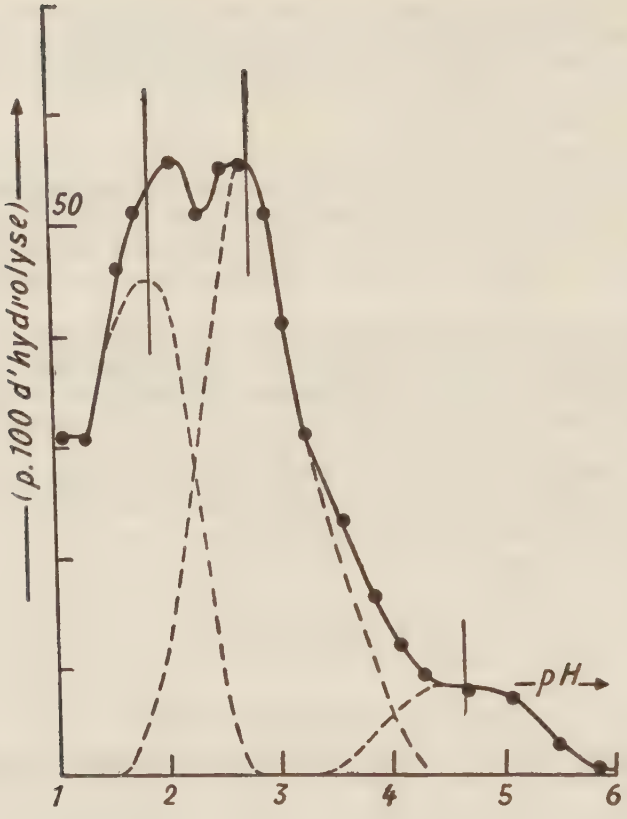

FIGURE 5

Spectre d'activité protéolytique de la pepsine cristallisée

L'examen du tableau IX et de la figure n° 5 montre la pluralité des activités de la pepsine cristallisée vis-à-vis de la globine. L'analyse graphique permet de montrer 3 activités optimum pour les pH respectivement égaux à 1,90, 2,80 et 4,50.

c) Justification

Afin de pouvoir contrôler les résultats que nous venons de donner nous avons réalisé des spectres d'activités enzymatiques de la pepsine cristallisée pour des taux d'hydrolyse différents de celui précédemment adopté ; pour cela nous avons effectué des protéolyses, pendant des temps respectivement égaux à 50, 60 et 120 minutes ; chaque expérience a été réalisée en double.

Ces résultats relatifs à chacune d'elles sont rassemblés dans les tableaux X, XI et les « spectres d'activités enzymatiques » correspondants dans les figures n^{os} 6, 7 et 8.

TABLEAU X

Données relatives à l'établissement
du « spectre d'activité enzymatique » de la pepsine cristallisée
pour une durée de la protéolyse égale à 50 minutes

pH	p. 100 d'hydrolyse	
	Exp. n° 1	Exp. n° 2
1,25		20
1,5	17,5	20
1,8	33	32,5
2,0	36,5	37
2,2	41,5	38
2,4	—	40
2,5	36,5	34,5
2,8	41,5	39,5
3,05	40,5	33
3,2	—	31
3,5	20	16
3,8	10,5	11
4,1	9,5	9
4,3	—	7
4,7	7,5	7
5,1	6,5	5
5,6	0	0
6,2	0	0

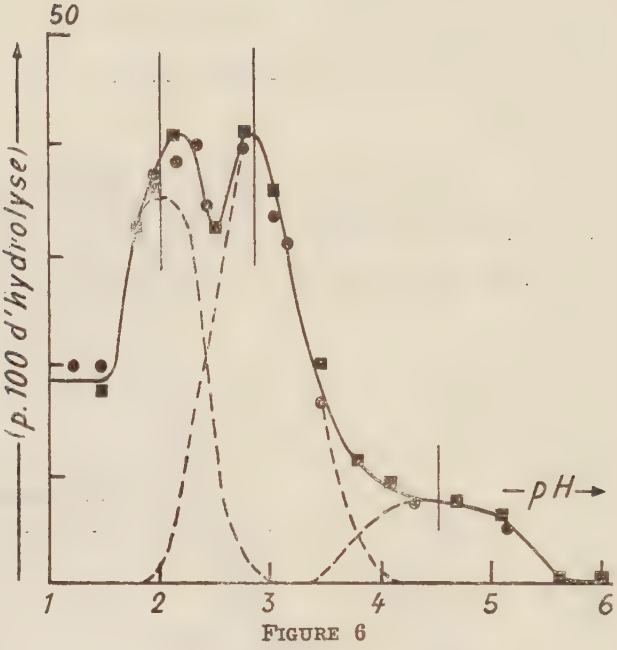

FIGURE 6

Spectre d'activité protéolytique de la pepsine cristallisée pour une durée de la protéolyse de 50 minutes

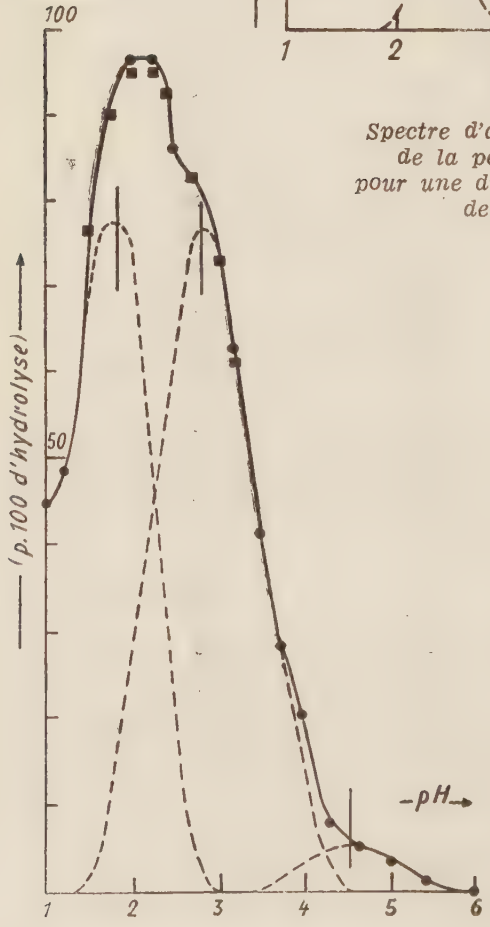

FIGURE 7

Spectre d'activité de la pepsine cristallisée pour une durée de la protéolyse de 120 minutes

TABLEAUX XI

Données relatives à l'établissement
du « spectre d'activité enzymatique » de la pepsine cristallisée
pour une durée de la protéolyse égale à 120 minutes

pH	p. 100 d'hydrolyse	
	Exp. n° 1	Exp. n° 2
0,9	45	
1,2	48,5	
1,5	76,5	77
1,75	90	90
2,0	96,5	95
2,2	96,5	95
2,4	92,5	92
2,5	88	90
2,8	78e	78
3,0	73	73
3,25	63	61
3,5	41,5	
3,75	28	
4,0	21,5	
4,25	7,8	
4,6	5	
5,0	3	
5,4	1,5	
6,1	0	

L'examen des tableaux et des graphiques montre la reproductibilité de nos résultats. En efet d'une part on peut constater que pour des expériences réalisées indépendamment mais pour lesquelles nous avons observé une même durée de protéolyse, le p. 100 de protéolyse pour un pH donné est pratiquement identique aux erreurs expérimentales près. D'autre part l'analyse graphique réalisée sur les spectres d'activité protéolytique permet ici aussi de conclure à la présence de 3 activités enzymatiques distinctes dans la pepsine cristallisée. Les valeurs des pH optimum d'action étant en moyenne de 1,95 - 2,80 et 4,55, valeurs en tout point comparables à celles obtenues au cours de notre première expérience et en bon accord avec les résultats de MERTEN et Coll. [34].

L'ensemble de ces résultats nous paraît justifier d'une part le protocole expérimental proposé ainsi que l'analyse graphique des « spectres d'activités enzymatiques ».

II. — SPECTRE D'ACTIVITE DE LA PANCREATINE OFFICINALE

L'établissement du spectre d'activité d ela pancréatine officinale nous a paru représenter un document d'un certain intérêt dans le but de caractériser les diverses activités protéolytiques d'un mélange complexe. Le protocole expérimental est en tout point comparable à celui précédemment exposé.

La solution enzymatique est constituée par une solution de 75 mg. de pancréatine officinale dans 100 ml. d'une solution à 0,3 p. 100 de carbonate de sodium. 2 ml. de cette solution sont susceptibles d'hydroxyder environ 50 p. 100 de substrat en 2 heures. Les résultats de cette expérience ainsi que l'analyse sont rassemblés sous forme de graphique dans la figure n° 8.

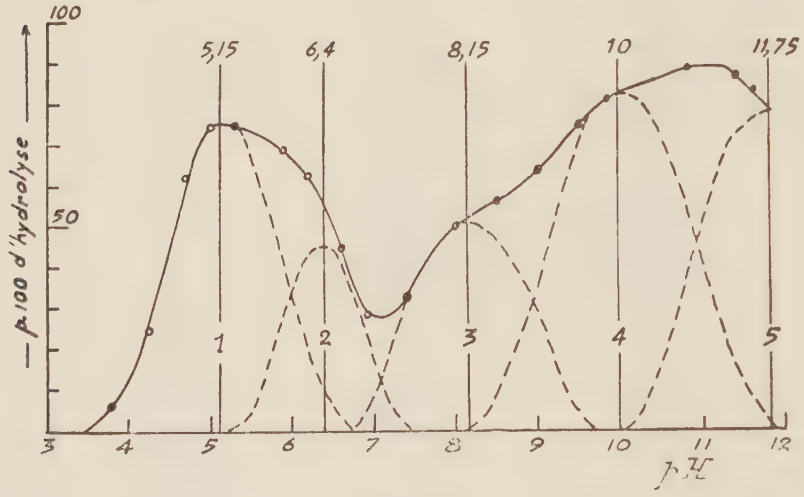

FIGURE 8

Détermination des pH optimum d'action des enzymes protéolytiques présents dans la pancréatine officinale
(En ordonnée les pourcentages d'hydrolyse. En abscisse les pH)

La courbe d'activité protéolytique de la pancréatine officinale en fonction du pH compris entre 3 et 12 (courbe en trait plein) présente essentiellement deux sommets pour les pH respectifs de 5 et de 11 mais aussi diverses inflections qui témoignent de la pluralité des actions enzymatiques de la pancréatine. L'analyse graphique permet de tracer différentes courbes en « cloche » (courbes en pointillé). Dans l'échantillon considéré on observe cinq activités (1, 2, 3, 4, 5) dont les pH optimum d'action sont respectivement de 5,15, de 6,4, de 8,15, de 10 et de 11,75. Ces résultats sont en accord avec les données classiques sur la constitution enzymatique du pancréas.

CONCLUSIONS

Il convient maintenant de dégager les principales conclusions auxquelles nos recherches nous ont conduite. Les considérations seront très brèves car elles portent sur des faits précis d'ordre technique, dont nous pouvons souhaiter que les applications ultérieures permettent des développements plus étendus.

Dans notre introduction nous avons tenté de rassembler d'une manière concise les principales données générales sur les propriétés des enzymes protéolytiques ainsi que les techniques analytiques permettant d'étudier l'activité de ces enzymes. De l'ensemble de cette documentation on peut tirer essentiellement que l'étude de l'activité des enzymes protéolytiques sur un substrat protéique semble à l'heure actuelle présenter encore un grand intérêt, en particulier par l'emploi de méhodes faisant appel à la détermination de la protéine demeurée intacte en un instant donné de la protéolyse, et est particulièrement satisfaisant en raison de la simplicité et de la précision des techniques analytiques qui sont mises en œuvre. Cependant l'emploi de l'acide trichloracétique déprotéinisant, le plus universellement utilisé, ne semble pas présenter des garanties suffisantes vis-à-vis de la précipitation du substrat protéique car il précipite en même temps que celui-ci des produits de la protéolyse.

Il apparaît donc qu'un défécant doué d'une plus grande spécificité permettrait plus sûrement d'aborder certains problèmes parmi lesquels il faut citer l'identification et la caractérisation des enzymes protéolytiques présentés dans un mélange complexe par leur pH optimum d'action.

Parmi les substances qui peuvent être proposées dans le but de se substituer à l'acide trichloracétique, l'acide phytique étudié par COURTOIS et ses élèves nous a paru posséder des avantages particuliers et c'est à l'étude de ce réactif que nous nous sommes attachés.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de nos recherches ont permis de confirmer que si en milieu acide, l'acide trichloracétique à une concentration de 10 %, permet d'insolubiliser totalement la globine il est aussi susceptible de précipiter à côté de cette dernière des peptides de poids moléculaires élevés qui résultent de l'hydrolyse de la globine par la pepsine. Le fait est également net dans le cas de peptides de poids moléculaires plus faibles tels que ceux résultant de l'attaque de la protéine par la pan-

créatine et par la papaïne. Par contre, et cela en accord avec les travaux de COURTOIS, l'acide phytique précipite pour des pH voisins de 2,4, la globine et elle seule, même si elle se trouve accompagnée de peptides résultant de l'action protéolytique de divers enzymes. L'acide phytique peut donc être considéré comme un déprotéinisant spécifique. La démonstration de ce fait nous semble établie par notre étude de la valeur du rapport de la quantité de phosphore à la quantité d'azote protéique du précipité de phytate de protéine obtenu à divers temps de la protéolyse de la globine par la pepsine, la pancréatine et la papaïne.

Cette étude nous a conduite à étudier divers facteurs d'ordre analytique permettant de déterminer la valeur du rapport P/N d'un précipité de phytate de protéine. Nous avons établi qu'au cours d'une protéolyse de la globine par les divers enzymes énumérés ci-dessus, l'acide phytique précipite une substance de nature protidique possédant un P/N = 0,31 identique à celui de la globine, ce qui nous a permis d'identifier cette protéine à la substance précipitant par l'acide phytique.

L'utilisation de l'acide phytique nous a amenée à mettre au point une méthode, pour l'étude des protéines, basée sur la mesure directe ou indirecte de la quantité de substrat demeuré intact aux différents instants de la protéolyse. Le plus souvent, on dosera l'azote protidique présent dans les filtrats de déprotéinisation des prélèvements de protéolysat par une méthode laissée au choix de l'expérimentateur ; toutefois, les dosages par microkjeldahl donnent des résultats qui échappent aux inconvénients de l'emploi d'unité conventionnelle qu'entraîne par exemple la méthode de LOWRY et Coll. Le microdosage d'azote permet de donner une valeur précise du pourcentage de substrat détruit.

Nous avons justifié la technique que nous préconisons par l'étude des activités de la pepsine cristallisée en fonction du pH. Le protocole que nous avons proposé à titre d'exemple permet d'établir à la suite de l'analyse graphique des résultats ce que nous avons appelé le « spectre des activités enzymatiques » d'un mélange complexe d'enzymes protéolytiques dont les constituants peuvent dès lors être identifiés par leur pH optimum d'action en adoptant l'hypothèse qui consiste à admettre que chaque activité enzymatique correspond à une courbe en cloche parfaitement symétrique. L'étude de la pepsine cristallisée nous a permis de constater que notre méthode permet de donner des résultats parfaitement reproductibles du point de vue analytique, ce qui offre les meilleures garanties pour l'interprétation des résultats.

La pepsine utilisée est constituée par une préparation hautement purifiée, c'est-à-dire douée d'une activité spécifique élevée — n'est composée que par un petit nombre de constituants enzymatiques. De ce fait, l'analyse des « spectres d'activité enzymatique » obtenus présente une très grande simplicité et la résolution des documents en trois courbes « en cloches » n'offre aucune ambiguité. L'analyse graphique des trois spectres d'activités obte-

nus à des degrés divers de la protéolyse, conduit à des résultats identiques, à savoir que la pepsine présente des activités protéinasiques correspondant aux pH optimum respectifs de 1,90, 2,15 et 3,50.

L'ensemble de ces considérations justifie, à notre avis, la technique analytique et le mode d'analyse graphique que nous proposons.

L'application de notre technique à l'étude de la pancréatine officinale permet de montrer la présence dans cette substance d'au moins cinq activités enzymatiques dont les pH optimum d'action sont respectivement de 5,15, 6,4, 8,15, 10 et 11,75. Ces résultats sont en bon accord avec les données classiques relatives à la constitution du système enzymatique du pancréas.

*
* *

En résumé, les résultats acquis au cours de notre travail sont les suivants :

1° Nous avons mis en évidence l'incontestable supériorité de l'acide phytique sur l'acide trichloracétique comme déprotéinisant de la globine lorsque celle-ci se trouve en présence de ses produits de dégradation enzymatique.

2° Nous proposons une technique qui permet d'étudier les activités des enzymes protéolytiques basée sur l'emploi de l'acide phytique qui conduit à l'établissement de « spectres d'activités enzymatiques » des mélanges complexes d'enzymes protéolytiques.

Une analyse graphique simple des documents amène la caractérisation des différentes activités d'un tel mélange par la détermination des pH optimum d'action.

LU et APPROUVE.
Le Président du Jury
Professeur C. DUMAZERT

VU et APPROUVE.
Pour le Doyen
L'Assesseur
Professeur J. DELPHAUT

VU et PERMIS D'IMPRIMER
AIX, le 23 Septembre 1960
Le Recteur
J. BLACHE

BIBLIOGRAPHIE

1. Anson (M.-L.), Mirsky (A.-E.). — *Journ. Gen. Physiol.*, 1930, *13*, 469.
2. Barre (R.), Courtois (J.-E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, *35*, 921.
3. Barre (R.), Courtois (J.-E.) — *Ann. Pharm. Fr.*, 1953, *11*, 653.
4. Barre (R.), Courtois (J.-E.), Delrieu (P.), Perles (R.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1954, *12*, 601.
5. Barre (R.), Courtois (J.-E.), Delrieu (P.), Perles (R.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1954, *12*, 501.
6. Barre (R.), Courtois (J.-E.), Wormser (G.). — *Ann. Acad. Sci. Fenn. S.A. II, Chemica*, 1955, *60*, 104.
7. Britton et Robison cités par Loiseleur (J.). in *Technique de Laboratoire*, p. 20, Masson, édit. 1954.
8. Buchs (S.). — *Enzymologia*, 1949, *13*, 208.
9. Carret (J.-M.). — Thèse Université Pharmacie, Marseille, 1955.
10. Courtois (J.-E.), Barre (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, *35*, 913.
11. Courtois (J.-L.), Barre (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, *31*, 740.
12. Courtois (J.-E.). Villiers-Huiban (H.). — *Ann. Pharm. Fr.*, 1956, *14*, 639.
13. Delsal (J.-L.)., Manhouri (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, *37*, 1041.
14. Desnuelle (P.)., Rovery (M.), Bonjour (G.). — *Biochem. Bioph. Acta*, 1950, *5*, 116.
15. Dumazert (C.), Marccelet (Y.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, *20*, 201.
16. Fleury (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, *25*, 201.
17. Folin (O.), Ciocalteu (V.). — *J. Biol. Chem.*, 1927, *73*, 627.
18. Foreman (F.-W.). — *Biochem. J.*, 1920, *14*, 451.
19. French (D.), Edsall (J.-T.). — In *Advances In Proteins Chemistry, Vol. II, Academic Press, New-York*, 1945, 278.
20. Fruton (J.-S.), Johnston (R.-B.), Fried (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, *190*, 39.
21. Fruton (J.-S.), Bergmann (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1939, *127*, 627.
22. Fruton (J.-S.). — *Ann. Rev. of Biochem. Stanford University*, 1947, *10*, 35.
23. Grassmann (W.). — *Ergeb. Enzymforsh.*, 1932, *1*, 133.
24. Grassmann (W.), Schneider. — *Ergeb. Enzymforsh.*, 1936, *5*, 79.
25. Grassmann (W.), Heyde (W.). — *Physiol. Chem.*, 1929, *183*, 32.
26. Hill (R.), Tyler (C.). — *J. Agric. Sc.*, 1954, *44*, 324.
27. Jacobsen (C.F.). — *Comp. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 1942, *24*, 281.
28. Kendrick (A.-B.), Hanke (M.-E.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, *117*, 161.
29. Linderstrom-Lang (K.). — *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 1927, *17*, n° 4.
30. Linderstrom-Lang (K.). — *Proteins and Enzymes, Stanford Univ. Press. Stanford*, 1952.
31. Linderstrom-Lang (K.), Jacobsen (C.-F.). — *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 1941, *21*, 1.
32. Lowry (O.-H.)., Farr (A.-L.)., Randall (R.-J.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, *193*, 265.

33. Mac Fadyen (D.-A.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, *145*, 387.
34. Merten (R.), Schramm (W.), Hannig (K.). — *Zeits. f. Physiol. Chem.*, 1952, *289*, 173.
35. Moore (S.), Stein (W.-H.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, *176*, 367.
36. Northrop (J.-H.). Kunitz (M.). Herriot (R.-M.). — *Crystalline Enzymes, 2nd ed., Columbia Univ. Press, New-York*, 1948.
37. Northrop (J.-H.). — *J. Gen. Physiol.*, 1921, *4*, 227.
37bis. Northrop (J.-H.). — *J. Gen. Physiol.*, 1931, *15*, 129.
38. Pope (C.-G.), Stevens (M.-F.). — *Biochem. J.*, 1939, *33*, 1070.
39. Pope (C.-G.), Stevens (M.-F.). — *J. Exp. Path.*, 1951, *32*, 314.
40. Reiss (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, *23*, 1163.
41. Sanger (F.), Tuppy (H.). — *Biochem. J.*, 1951, *49*, 463.
42. Sanger (F.), Thompson (E.-O.-P.). — *Biochem. J.*, 1953, *53*, 366.
43. Schales (O.) in J.-B. Sumner and K. Myrback, eds. *The Enzymes, Vol. II, Academic Press, New-York*, 1951, Part I, 216.
44. Singer (T.-P.), Kearney (E.-B.). — *Arch. Biochem.*, 1950, *27*, 348 ; *Arch. Biochem.*, 1950, *29*, 190.
45. Sorensen (S.-P.-L.). — *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 1907, *7*, 1.
46. Tiselius (A.), Henschen (G.-E.), Svensson (H.). — *Biochem. J.*, 1938, *32*, 1814.
Agreen (G.), Hammarsten (E.) — *Enzymologica*, (Amsterdam), 1937, *4*, 49.
Steinhardt (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, *123*, 115 ; *Ibid.*, 1939, *129*, 135.
Wiedemann (F.). — *Scientia Pharmaceutica* (Wien), 1939, *129*, 135.
Hoch (H.). — *Nature* (London), 1950, *165*, 278.
Herriot (H.-M.), Desreux (V.), Northrop (J.-M.). — *J Gen. Physiol.*, 1940, *23*, 439.
47. Van Slyke (D.-D.). — *J. Biol. Chem.*, 1911, *9*, 185.
48. Van Slyke (D.-D.), Neill (J.-M.). — *J. Biol. Chem.*, 1924, *61*, 523.
49. Van Slyke (D.-D.), Dillon (R.-T.), Mac Fadyen (D.-A.), Hamilton (P.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, *141*, 627.
50. Von Emler (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1907, *35*, 465.
51. Waldschmidt-Leitz (E.), Schaffner (E.), Beck (E.), Blum (E.). — — *Z. Physiol. Chem.*, 1930, *188*, 17.
52. Waldschmidt-Leitz (E.), Purr (A.). — *Zeetschr. f. Physiol. Chem.*, 1931, *198*, 260.
53. Willstaetter (R.)., Bammann (Z.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1938, *180*, 127.
54. Willstaetter (R.), Waldschmidt-Leitz (E.). — *Ber.*, 1921, *54*, 2988.
55. Zamecnik (P.-C.), Lavin (G.-J.)., Bergmann (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, *158*, 537.
56. Zeller (E.-A.), Maritz (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1944, *27*, 1888 ; *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1945, *3*, C 6, C 47, C 48.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 15

A. — Méthodes permettant de doser les groupements aminés ou carboxyliques 21

I. Méthodes titrimétriques 21

II. Méthodes gazométriques 22

B. — Méthodes basées sur la détermination du substrat intact ou des produits de la protéolyse 25

I. Méthode colorimétrique à la Ninhydrine 25

II. Méthodes faisant appel à l'élimination du substrat intact 25

Méthodes basées sur des principes particuliers 26

OBJET DU TRAVAIL 26

RECHERCHES PERSONNELLES 31

CHAPITRE PREMIER

Réactifs et techniques analytiques 31

a) Substrat : Préparation de la globine 31

b) Milieu réactionnel tamponné 32

c) Réactifs déféquants 33

d) Dosage de l'azote protéique 33

e) Dosage du phosphore 34

f) Dosage des substances protéiques par le procédé de Lowry, Rosebourg, Farr et Randal 35

CHAPITRE II

Sur la solubilité de la globine en fonction du pH, en l'absence ou en présence d'acide phytique ou trichloracétique 37

I. Etude de la solubilité de la globine dénaturée en fonction du pH 37

II. Etude de la précipitation de la globine par l'acide phytique en fonction du pH 39

III. Etude de la précipitation de la globine par l'acide trichloracétique en fonction du pH 41

CHAPITRE III

Comparaison entre les déprotéinisations phytique et trichloracétique 43

I. Etude de la valeur du rapport P/N des précipités phytiques obtenus à des temps différents de la protéolyse de la globine par la pepsine, la pancréatine, la papaïne 44

II. Etude comparée des déprotéinisations par l'acide phytique des protéolysats enzymatiques de globine 48

CHAPITRE IV

Spectre d'activité *enzymatique* 53

I. Spectre d'activité enzymatique de la pepsine cristallisée 54

II. Spectre d'activité de la pancréatine officinale 60

CONCLUSIONS 61

BIBLIOGRAPHIE 65